

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ECLÉIA ALEXANDRA POLTRONIERI BUDA SALLES

MICROPROPAGAÇÃO DE *Acacia mearnsii* De Wild.

CURITIBA

2014

ECLÉIA ALEXANDRA POLTRONIERI BUDA SALLES

MICROPROPAGAÇÃO DE *Acacia mearnsii* De Wild.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Área de Silvicultura, Departamento de Ciências Florestais, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Engenharia Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rioyei Higa
Co-orientadores: Prof.^a Dra. Marguerite Quoirin; Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves.

Curitiba

2014

Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR
Ficha catalográfica elaborada por Denis Uezu – CRB 1720/PR

Salles, Ecléia Alexandra Poltronieri Buda

Micropropagação de *Acacia mearnsii* De Wild. / Ecléia Alexandra Poltronieri Buda Salles. – 2014

113 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rioyei Higa

Coorientador: Prof.^a Dra. Marguerite Quoirin

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba, 27/02/2014.

Área de concentração: Silvicultura

1. Acácia - Propagação. 2. Reguladores de crescimento. 3. Teses. I. Higa, Antonio Rioyei. II. Quoirin, Marguerite. III. Gonçalves, Antonio Natal. IV. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. V. Título.

CDD – 634.9

CDU – 634.0.232.1





Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias - Centro de Ciências Florestais e da
Madeira
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

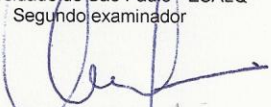
PARECER

Defesa nº. 1021

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, após arguir o(a) mestrando(a) *Ecléia Alexandra Poltronieri Buda Salles* em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado "**MICROPROPAGAÇÃO DE *Acacia mearnsii* De Wild.**", é de parecer favorável à APROVAÇÃO do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de *Mestre* em Engenharia Florestal, área de concentração em SILVICULTURA.


Dr. Juliana Degenhardt Goldbach
Embrapa Florestas
Primeiro examinador


Dr. Luciana Duque Silva
Universidade de São Paulo - ESALQ
Segundo examinador


Dr. Antônio Riroy Higa
Universidade Federal do Paraná
Orientador e presidente da banca examinadora



Curitiba, 27 de fevereiro de 2014.


Antônio Carlos Batista
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

Ao Eduardo, meu esposo, e às minhas filhas Stephanie e Rebeca.
Aos meus pais Nicola e Zumilde e irmã Milquéia.
Por todo amor, pelo incentivo aos estudos, por quem sou e por tudo que
alcancei.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e proteção.

À minha querida família pelo apoio, incentivo, compreensão e incondicional amor. Em especial ao meu amado esposo Eduardo e filhas Stephanie e Rebeca por fazerem da minha vida um caminho cheio de alegria, esperança e luz.

Ao professor Antonio R. Higa, pela orientação, incentivo, apoio, confiança e amizade.

Aos professores Marguerite Quoirin e Antonio Natal Gonçalves pela co-orientação, paciência, apoio e compreensão.

À empresa TANAGRO® pelo apoio e incentivo no projeto, em especial ao Jackson B. de São José e Marcos Behling pela colaboração.

Aos colegas de pós-graduação Rafael e Paulo André pela amizade e conhecimento em estatística compartilhado, juntamente com a Andrea e pelo bom exemplo de eficiência do Mário.

Às alunas de iniciação científica Melrian, Vanessa e Jéssica e ao Sérgio pela amizade, companheirismo e colaboração na realização deste trabalho.

E aos demais integrantes do LAMEF, que de forma direta ou indireta, contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

À Dona Carmen pelo apoio, carinho, paciência, força e eficiência.

À técnica Angela pela amizade, apoio, eficiência e sábios conselhos.

Enfim, a todos os colegas e amigos que encontrei nesta empreitada e serão levados comigo dentro do coração.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Acacia mearnsii De Wild. (acácia negra) é natural da Austrália, e sua madeira é utilizada para energia, carvão, cavaco para celulose e painéis. Da casca é retirado tanino, utilizado por diversos setores industriais. A clonagem de genótipos superiores é um dos métodos de melhoramento que pode ser aplicado para a espécie, mas a estaquia é limitada pelo baixo enraizamento de alguns clones. Este estudo teve como objetivo aprimorar o protocolo de micropropagação da espécie, como alternativa para clonagem massal. Dois tipos de material vegetal foram utilizados: segmentos nodais provenientes do jardim clonal e plântulas provenientes da germinação de sementes *in vitro*. Antes da introdução *in vitro*, os segmentos nodais com uma a duas gemas axilares, foram desinfestados combinando diferentes produtos (álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio, ácido clorídrico, cloreto de mercúrio, PPM®), concentrações e tempos de imersão. As avaliações da desinfestação foram feitas aos 7, 15 e 30 dias. O meio de cultura utilizado em todas as etapas foi o MS com $\frac{3}{4}$ dos sais e dosagem completa de vitaminas, compostos orgânicos e 30g. L⁻¹ de sacarose, com ou sem adição de carvão ativado. Após 45 dias, segmentos nodais, contendo uma gema axilar, foram subcultivados em meio MS $\frac{3}{4}$, com adição de reguladores vegetais. Foram testados BAP (0; 2,2; 4,4; 8,8 µM), TDZ (0; 0,2; 0,4; 0,8 µM), cinetina (0; 2,2; 4,4; 8,8 µM), GA₃ (0; 2,2; 4,4; 8,8 µM) e combinações de BAP (2,2; 11; 22 µM) com GA₃ (2 µM). Avaliações foram realizadas aos 30 e 60 dias. Os explantes derivados do experimento com BAP foram transferidos para novo meio de cultura, com carvão ativado e sem regulador vegetal para alongamento dos brotos. Após dois subcultivos, este material foi levado para aclimatização. As mudas micropropagadas, separadas em duas classes de tamanho (2 a 4,9 cm e 5 a 8 cm), foram acondicionadas em casa de enraizamento por 40 dias. Após este período, foram transferidas para casa de sombra por uma semana e depois para área de rustificação do viveiro. As avaliações de sobrevivência e crescimento foram realizadas aos 90, 120 e 150 dias. Os dados foram analisados usando o programa IBM SPSS Statistics 19®. O melhor tratamento de desinfestação foi a combinação de álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio a 3%, cloreto de mercúrio a 0,4%, com 80% de sobrevivência, aos 15 dias de introdução *in vitro*, não houve desenvolvimento de novas gemas e, aos 30 dias, não havia sobreviventes. Para plantas oriundas de sementes germinadas *in vitro*, a maior taxa de multiplicação (média de 7,95 gemas/ segmento nodal) foi obtida no subcultivo em meio de cultura com carvão ativado sem reguladores vegetais. O carvão ativado promoveu alongamento dos explantes. Na aclimatização, mais de 90% das mudas micropropagadas sobreviveram, independente do tamanho inicial e, aos 150 dias, as alturas médias não diferiam estatisticamente.

Palavras-chave: Desinfestação. Regulador vegetal. Acácia negra.

ABSTRACT

Acacia mearnsii De Wild.(black wattle) is native of Australia, and its wood is used for energy, coal, and pulp and panels industries. The tannin extracted from the bark is used by various industrial sectors. The use of clonal forest, as a productivity improvement technique for the species, is limited by low rooting percentage of some selected clones. This study aimed to enhance micropropagation protocol of the species as an alternative for mass cloning. Two types of plant material were used: nodal segments collected from the clonal garden and seedlings originated from seed germinated *in vitro*. Prior to the introduction *in vitro* nodal segments with two axillary buds, collected from clonal garden, were disinfected using solutions combining several products (70% ethyl alcohol, sodium hypochlorite, hydrochloric acid, mercuric chloride, PPM®), with different concentrations and dipping times. Evaluations were carried out after 7, 15 and 30 days. The culture medium used in all stages was MS (Murashige and Skoog, 1962) with three quarters of salts, full strength vitamins and organic compounds, 30 g.L⁻¹ sucrose, with or without addition of activated carbon. After 45 days, nodal segments containing an axillary bud were transferred to fresh medium with addition of plant growth regulators. BAP (0, 2.2, 4.4, 8.8 µM), TDZ (0, 0.2, 0.4, 0.8 µM), kinetin (0, 2.2, 4.4, 8.8 µM), GA₃ (0, 2.2, 4.4, 8.8 µM), and combinations of BAP (2.2, 11, 22 µM) with GA₃ (2 µM) were tested. Evaluations were performed after 30 and 60 days. Explants derived from the treatments with BAP were transferred to a new culture with activated charcoal and without growth regulators for elongation of shoots. After two subcultures, this material was acclimatized. For this, the plantlets were separated into two classes of sizes (2-4.9 cm and 5-8 cm) and placed in a greenhouse for 40 days. After this period, the plantlet were transferred a shade house for a week and then to the full sun area. Survival and height growth were evaluated at 90, 120 and 150 days. Data were analyzed using IBM SPSS Statistics 19 ® program. The best disinfestation treatment was a combination of 70% ethanol, sodium hypochlorite 3%, mercuric chloride at 0.4 %, with 80% survival at 15 days after introduced *in vitro*, but there was no development of new buds. For seedlings germinated *in vitro*, the best multiplication rate (5.89 buds/nodal segment) was obtained in the culture medium added with 8.8 µM BAP. Activated charcoal promoted elongation of the explants. Regardless the size, more than 90% of seedlings survived after the acclimatization, and their heights did not differ statistically at 150 days of age.

Keywords: Disinfestations. Plant growth regulators.Black wattle.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESUMO DOS TRATAMENTOS PRELIMINARES DE DESINFESTAÇÃO PARA INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Acacia mearnsii</i>	33
TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES DE NaOCl e HgCl ₂ TESTADOS E TEMPOS DE IMERSÃO NO HgCl ₂	34
TABELA 3 - HgCl ₂ COMBINADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaOCl NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Acacia mearnsii</i>	34
TABELA 4 - DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM SOLUÇÃO DESINFESTANTE COM PPM® E 1 OU 2 ml.L ⁻¹ NO MEIO DE CULTURA.....	35
TABELA 5 - EXPERIMENTOS COM SOLUÇÃO DESINFESTANTES DE HCl SOZINHO E HgCl ₂ SOZINHO OU COMBINADO COM NaOCl OU HCl.....	36
TABELA 6 - RESULTADOS DOS TESTES PRELIMINARES DE DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Acacia mearnsii</i>	38
TABELA 7 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE IMERSÃO EM CLORETO DE MERCÚRIO SEGUIDO DE IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Acacia mearnsii</i> APÓS TRATAMENTO COM ÁLCOOL ETÍLICO 70% POR 15 SEGUNDOS E CERCOBIN® 0,2% POR 10 MINUTOS AOS 12 DIAS DE INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	40
TABELA 8 - EFEITO DE TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO APLICADOS EM SEGMENTOS NODAIS DE <i>Acacia mearnsii</i> AOS 30 DIAS DA INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	42
TABELA 9 - EFEITO DO CLORETO DE MERCÚRIO E HIPOCLORITO DE SÓDIO NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Acacia mearnsii</i> COM TAMANHOS DE 4 mm E 10 mm AOS 15 DIAS DE INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	43

TABELA 10 - EFEITO DE TRATAMENTOS COM PPM (<i>PLANT PRESERVATIVE MIXTURE</i> ®) APLICADOS A SEGMENTOS NODAIS DE <i>A. mearnsii</i> AOS 15 DIAS DA APLICAÇÃO.....	43
TABELA 11 - RESULTADOS DA ANOVA DO EXPERIMENTO FATORIAL COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PPM ® ADICIONADO AO MEIO DE CULTURA E DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE PPM PARA INTRODUÇÃO <i>INVITRO</i> DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>A. mearnsii</i> . AOS 27 DIAS DE INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	44
TABELA 12 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO TESTANDO ÁCIDO CLORÍDRICO EM DIFERENTES TEMPOS PARA INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>A. mearnsii</i> APÓS 15 DIAS DE CULTIVO.....	45
TABELA 13 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO TESTANDO DOIS TEMPOS DE IMERSÃO NO HgCl ₂ E ADIÇÃO DE PRODUTOS (NaOCl E HCl) NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>A. mearnsii</i> APÓS 7 DIAS DE INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	46
TABELA 14 - RESUMO DOS TRATAMENTOS COM REGULADORES VEGETAIS NAS ETAPAS DE MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO.....	59
TABELA 15 - EFEITO DO BAP NA FORMAÇÃO DE BROTO, CALOS NA BASE DO EXPLANTE E RAÍZES APÓS 30 DIAS DE CULTURA DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Acacia mearnsii</i> EM MEIO DE CULTURA MS COM ¾ DE SAIS.....	64
TABELA 16 - EFEITO RESIDUAL DO BAP NO SUBCULTIVO DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>A. mearnsii</i> , EM MEIO DE CULTURA MS ¾ COM ADIÇÃO DE 2 g. L ⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO, AOS 45 DIAS.....	66
TABELA 17 - EFEITO DA CINETINA E DO TDZ NA MULTIPLICAÇÃO, ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>A. mearnsii</i> APÓS 30 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> NO MEIO MS ¾.....	68
TABELA 18 - COMBINAÇÕES DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP COM GIBERELINA AOS 30 DIAS DE CULTIVO....	70

TABELA 19 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO GIBERELICO (GA_3) NO ALONGAMENTO DOS BROTOS, AOS 30 DIAS.....	71
TABELA 20 - INFLUÊNCIA DO TAMANHO DAS MUDAS MICROPROPAGADAS NA ACLIMATIZAÇÃO E RUSTIFICAÇÃO, APÓS 150 DIAS.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA - ácido indol acético

AIB - ácido indol 3-butírico

BAP - 6-benzilaminopurina

BA - 6-benziladenosina

CA - carvão ativado

CIN - cinetina

DBC - Delineamento em Blocos ao Acaso

DIC - Delineamento Inteiramente Casualizado

GA3 - ácido giberélico

MS - meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962)

$\frac{3}{4}$ MS - meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962), com a concentração de sais minerais 25% reduzida.

PPM - *Plant Preservative Mixture*®

p/v - porcentagem em massa/volume (x g do soluto em 100 mL da solução)

TDZ - thidiazuron

v/v - porcentagem em volume/ volume (x mL do soluto em 100 mL da solução)

WPM - "Woody Plant Medium" meio de cultura de LLOYD e McCOWN (1981)

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 OBJETIVO GERAL.....	11
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 <i>ACACIA MEARNSII</i>	13
2.1.1 Distribuição natural	13
2.1.2 Descrição Botânica	14
2.1.3 Utilizações.....	15
2.2 MICROPROPAGAÇÃO	15
2.2.1 Fases da Micropropagação.....	16
2.2.2 Desinfestação	16
2.2.3 Meio de cultura	18
2.2.4 Reguladores Vegetais.....	20
REFERÊNCIAS	23
3 CAPÍTULO 1 - DESINFESTAÇÃO E INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Acacia mearnsii</i> De Wild.....	27
RESUMO	27
ABSTRACT	28
3.1 INTRODUÇÃO	29
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.2.1 Local de realização dos experimentos	30
3.2.2 Preparo das cepas no jardim clonal.....	30
3.2.3 Desinfestação e introdução in vitro de <i>Acacia mearnsii</i>	31
3.2.4 Análises estatísticas.....	36
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.3.1 Efeito do hipoclorito de sódio e do cloreto de mercúrio.....	37
3.3.2 Efeito do ppm utilizado como solução desinfestante e adicionado ao meio de cultura	43
3.3.3 Efeito do uso de HCl sozinho ou combinado com HgCl ₂ ou NaOCl para desinfestação de segmentos nodais de <i>Acacia mearnsii</i> ..	45
3.4 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	50
4 CAPÍTULO 2 - MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Acacia mearnsii</i> De Wild. A PARTIR DE PLÂNTULAS CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>.....	53
RESUMO	53
ABSTRACT	54

4.1	INTRODUÇÃO	55
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	58
4.2.1	Material vegetal.....	58
4.2.2	Multiplicação, alongamento e enraizamento	58
4.2.2.1	Condições e meios de cultura.....	58
4.2.2.2	Delineamento experimental e análise estatística	59
4.2.3	Experimentos Desenvolvidos	60
4.2.3.1	Efeito de diferentes concentrações de BAP na multiplicação ...	60
4.2.3.2	Efeito de diferentes concentrações de cinetina ou TDZ na multiplicação	60
4.2.3.3	Efeito de diferentes combinações de BAP combinada com giberelina (GA ₃) na multiplicação e alongamento	61
4.2.3.4	Efeito de diferentes concentrações de GA ₃ no alongamento ...	61
4.2.4	Aclimatização/rustificação <i>ex vitro</i>	61
4.2.4.1	Influência do tamanho das micromudas.....	61
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.3.1	Efeito de diferentes concentrações de BAP na multiplicação ...	62
4.3.2	Efeito de diferentes concentrações de cinetina ou TDZ na multiplicação	66
4.3.3	Efeito de diferentes concentrações de BAP combinada com giberelina (GA ₃)	69
4.3.4	Efeito de diferentes concentrações de giberelina (GA ₃) no alongamento de segmentos nodais de <i>Acacia mearnsii</i>	70
4.3.5	Influência do tamanho das mudas micropropagadas na aclimatização e rustificação <i>ex vitro</i>	71
4.4	CONCLUSÕES	73
	REFERENCIAS	75
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79

1 INTRODUÇÃO

Entre as espécies florestais, o gênero *Acacia* é o quarto mais plantado no Brasil, ocupando uma área de 148.311 ha em 2012 (ABRAF, 2013). *Acacia mearnsii* De Wild., conhecida como acácia negra, é plantada em diversos países, com destaque para África do Sul e Brasil (BECK *et al.*, 1998), principalmente no estado do Rio Grande do Sul. Da sua casca é retirado tanino utilizado em diversos setores industriais como: curtumes, adesivos, petrolíferos e borrachas (ABRAF, 2013). É uma espécie com grande potencial econômico, promissora em sistemas agroflorestais, cuja madeira é utilizada como matéria-prima na indústria de papel, celulose, madeira compensada (ROVERSI *et al.*, 2002) e carvão vegetal de alta qualidade (HUANG *et al.*, 1994). Pode ser empregada em regiões subtropicais, para proteção e recuperação de solos degradados. É uma espécie que forma simbiose com bactérias do solo (*Rhizobium*) e fixa nitrogênio atmosférico (QUOIRIN, 2003).

Seu cultivo, em escala comercial, é estabelecido a partir de mudas produzidas por sementes. Isso acarreta variabilidade entre os indivíduos de um povoamento e conseqüentemente, na produtividade da floresta (VENGADESAN *et al.*, 2002; DISARZ e CORDER, 2009). Plantios clonais de indivíduos superiores, selecionados dentro de um programa de melhoramento genético, gerariam altos ganhos em produtividade (VENGADESAN *et al.*, 2002), mas a dificuldade da espécie em produzir clones por estaquia, em função das baixas taxas de enraizamento de alguns indivíduos selecionados (média de 30% de enraizamento) constitui um empecilho para o uso desta técnica em larga escala (SÃO JOSÉ, J. B. e BEHLING, M., comunicação pessoal, 2012).

O uso de técnicas de micropropagação pode ser uma alternativa para plantas de difícil enraizamento por estaquia, como no caso da espécie *A. mearnsii*. Em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, esta técnica possibilita a multiplicação rápida de indivíduos selecionados, proporcionando mudas de boa qualidade e uma taxa maior de enraizamento (FRAMPTON e HODGES, 2005). A alta taxa de multiplicação de plantas micropropagadas acelera os programas de propagação clonal e possibilita a clonagem de indivíduos e famílias de alto valor comercial e de difícil enraizamento.

Existem relatos de sucesso da micropropagação com material proveniente de campo para as espécies *A. senegal*, *A. nilotica*, *A. auriculiformis*, *A. sinuata* e *A. mangium* (VENGADESAN *et al.*, 2002). Para *A. mearnsii*, a desinfestação e introdução *in vitro* foram descritas por Correia e Graça (1995); Beck e Dunlop (1998); Beck, Dunlop e Staden (2000). Porém, o produto utilizado para a desinfestação (fungicida Benomyl®), atualmente, não tem autorização legal de uso no Brasil. O sucesso na descontaminação varia conforme a solução desinfestante utilizada e o tempo de exposição no produto, por isso se faz necessária a adequação de protocolos de desinfestação (MORAES *et al.*, 2007).

Segundo Disarz e Corder (2009), a técnica da propagação *in vitro* de *A. mearnsii* tem sua problemática na definição do meio básico a ser utilizado e o balanço adequado entre auxinas e citocininas, principalmente na etapa de multiplicação de gemas.

Outro obstáculo na micropropagação é na etapa de aclimatização, pois existe dificuldade em se transferir com sucesso as mudas produzidas *in vitro* para o ambiente externo, em razão da diferença entre as duas condições (READ e FELLMAN, 1985). Fatores como genótipo, estresse hídrico, alteração do metabolismo heterotrófico (*in vitro*) para autotrófico, infecção por patógenos e estresse pela luz, além das variações de temperatura, interferem no sucesso da aclimatização (SILVA *et al.*, 2003).

Dada a necessidade de multiplicação massal de material geneticamente superior no melhoramento genético da espécie, surge a necessidade de se desenvolverem protocolos de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Acacia mearnsii*.

1.1 OBJETIVO GERAL

Aprimorar o protocolo de micropropagação de genótipos superiores de *Acacia mearnsii* De Wild.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar protocolo de desinfestação para introdução *in vitro* de segmentos nodais de indivíduos selecionados;
- b) Avaliar os efeitos de reguladores vegetais na multiplicação, alongamento e enraizamento de mudas germinadas *in vitro* e assegurar a sobrevivência durante a aclimatização e rustificação das mudas micropropagadas provenientes de material seminal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Acacia mearnsii*

2.1.1 Distribuição natural

O gênero *Acacia* envolve cerca de 1.300 espécies distribuídas em todo o mundo, particularmente na África, Ásia e Austrália (BROCKWELL *et al.*, 2005). No Brasil, *A. mearnsii*, também conhecida como acácia-negra ou mimosa, foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul em 1918. Os primeiros plantios comerciais foram realizados em 1928 no município de Estrela (OLIVEIRA, 1960).

Segundo BOLAND *et al.* (1984), a descrição da espécie foi feita em 1925, por De Wild, tendo como base uma planta cultivada perto de Thikao (Quênia), pensando ser, erroneamente, uma planta nativa desse local.

Os detalhes a seguir são relatados por BOLAND *et al.* (1984):

A. mearnsii é uma espécie originária do sudeste da Austrália, principalmente da planície costeira e de baixas altitudes nas serras e nos planaltos adjacentes, ocorrendo naturalmente desde o município de Sydney (New South Wales – NSW) até o sudoeste do Estado de South Australia, nas regiões de baixa a média altitude da Tasmânia, principalmente entre as latitudes 34° e 43 °S e altitude de 850m acima do nível do mar. A distribuição de zona climática em mês quente e úmido ou sub úmido, com temperatura média máxima de 25 - 28°C (mês mais quente) e temperaturas de 0 -5°C no mês mais frio. Média de 105 – 175 dias de chuvas por ano, 625 - 1000 mm.

A região de ocorrência natural da acácia negra está ilustrada na figura 1.

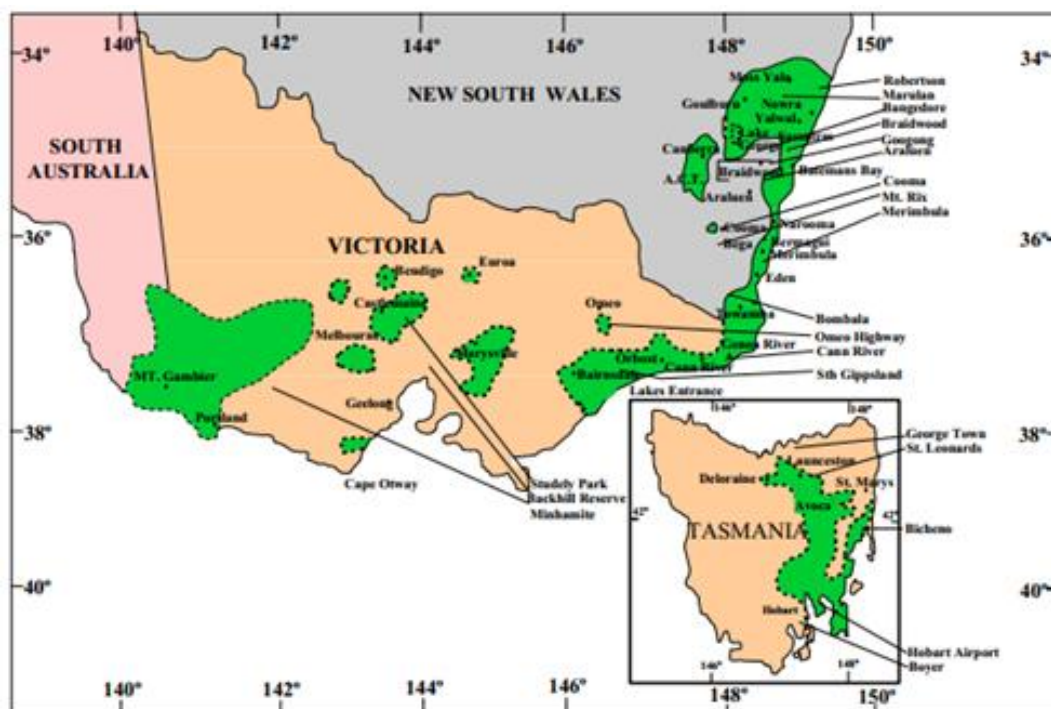


FIGURA 1 - Região de ocorrência natural da acácia negra (Austrália). FONTE: MORA (2002), adaptado de SHERRY (1971), BOOTH; SEARLE; BOLAND (1989), BLEAKLEY; MATHESON (1992) E SEARLE; BELL; MORAN (2000)

2.1.2 Descrição Botânica

As acácias pertencem à família Fabaceae, que está subdividida em seções, que agrupam espécies com características morfológicas distintas (BOLAND *et al.*, 1984), sendo: subgênero *Aculeiferum* Vassal (representada pelas seções *Vulgaris* Benth. e *Filicinae* Benth.); subgênero *Heterophyllum* Vassal (representada pelas seções *Phyllodineae* Benth., *Botryocephalae* Benth. e *Pulchellae* Benth.); subgênero *Acacia* (representada pela seção *Gummiferae* Benth.). A seção *Botryocephalae* inclui aproximadamente 36 espécies do gênero *Acacia* originárias da Austrália, entre elas *Acacia mearnsii* (BOLAND, 1987).

Acacia mearnsii De Wild., segundo BOLAND *et. al.* (1984):

Em sua área de ocorrência natural, caracteriza-se por ser um grande arbusto ou uma pequena árvore, comumente alcançando de 6 a 10 m de altura, atingindo às vezes 15 m, quando em conjunto com outras árvores, geralmente apresenta fuste retilíneo. Em árvores jovens, na parte superior, a casca é fina, lisa e de coloração clara. Em árvores adultas, geralmente apresenta-se com coloração preto-amarronzada, dura e fissurada. A folhagem apresenta cor verde escura, com os brotos novos suavemente amarelos. As folhas são bipinadas, com 8 a 21 pares de pinas, cada uma com 15 a 70 pares de folíolos, medindo 1,5 a 4,0 mm de comprimento por 0,5 a 0,75 mm de largura, com

glândulas presentes entre os pares de pinas na parte superior da folha. As folhas compostas variam entre 8 e 12 cm de comprimento, com as folhagens das mudas apresentando de 4 a 8 pares opostos de pinas, cada uma composta por 20 a 25 pares de folíolos oblongos. As inflorescências são paniculares terminais ou axilares, com tamanho aproximado ao tamanho da folha, composta por 20 a 30 flores hermafroditas com coloração amarelo claro. Na Austrália, floresce entre outubro e dezembro, principalmente no mês de novembro. Os frutos são vagens relativamente retas, levemente pilosas, medindo entre 5 e 15 cm de comprimento por 4 a 8 mm de largura. A madeira apresenta albúmeno muito claro e o cerne é marrom claro com manchas avermelhadas, muito duro e resistente, com boa textura, comumente com grã reversa ou entrelaçada, durabilidade baixa a moderada e densidade básica próxima de 800 kg/m³.

2.1.3 Utilizações

A. mearnsii é uma espécie de amplo aproveitamento industrial. Fornece diversos produtos utilizados como matéria-prima para indústrias. Da sua casca são retirados extratos vegetais ricos em tanantes e fenóis, que originam os taninos, largamente utilizados no curtimento do couro; os floculantes, que são utilizados em processos de tratamento de água; condicionadores de lama para perfuração de poços de petróleo; os adesivos de madeira e resinas, a base fenólica, etc. É a principal fonte de casca para a indústria de taninos vegetais em nível mundial (MORA, 2002).

O tanino produzido no Rio Grande do Sul é exportado para mais de oitenta países e representa mais de 10% da produção mundial de tanantes. A madeira é utilizada para fabricação de painéis, cavaco para celulose, carvão e energia (ABRAF, 2013).

A acacicultura apresenta elevada potencialidade em consequência do rápido crescimento da acácia negra, da rotação curta (em torno de oito anos) e do aproveitamento da casca além da madeira (SCHNEIDER, 2000).

2.2 MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* possui essa denominação devido ao tamanho dos propágulos utilizados (TORRES *et al.*, 1998). É a aplicação de técnicas de cultura de tecidos para multiplicação de

plantas utilizando pequena parte do vegetal. Engloba vários protocolos de regeneração a partir de órgãos e/ou tecidos de plantas que são introduzidos *in vitro*, estabelecidos e mantidos em culturas assépticas para regenerar novas plantas (HARTMANN *et al.*, 2002).

A cultura de tecidos vegetais tem várias aplicações práticas. É considerada uma excelente ferramenta para clonar plantas em escala comercial, realizar transformação genética e conservação de germoplasma de espécies vegetais. A micropropagação é, também, utilizada para propagação de genótipos selecionados, produção de compostos do metabolismo secundário e propagação de plantas livre de vírus (GEORGE *et al.*, 2008).

Os propágulos utilizados são denominados explantes (folhas, gemas apicais ou axilares, segmentos nodais, dentre outros). A possibilidade de utilização de vários tipos de explantes para iniciar a cultura se baseia na teoria da totipotência das plantas de regenerar um novo indivíduo a partir de explantes unicelulares ou pluricelulares (TORRES *et al.*, 2000).

2.2.1 Fases da Micropropagação

Os estágios de desenvolvimento da micropropagação são constituídos de fases que incluem a desinfestação para obtenção de culturas livres de contaminantes na introdução do explante *in vitro*, a multiplicação dos propágulos vegetativos, o enraizamento e a aclimatização na condição *ex vitro* das plantas obtidas *in vitro* (GEORGE *et al.*, 2008; XAVIER *et al.*, 2009). O estágio preliminar, *ex vitro*, correspondente ao tratamento destinado à planta matriz, torna-se necessário para o fornecimento de explantes mais adequados e responsivos ao cultivo *in vitro* (GEORGE *et al.*, 2008). De acordo com a espécie e os objetivos a serem alcançados, algumas dessas fases podem ser mais prolongadas e/ou uma fase pode ser adicionada, bem como outras podem não ser necessárias (XAVIER *et al.* 2009).

2.2.2 Desinfestação

Um dos desafios da clonagem de plantas *in vitro*, a partir de propágulos oriundos do campo ou viveiro, é a assepsia dos explantes. O Brasil, com a diversidade de microclimas e plantas, tem uma ampla gama de interações microrganismo/hospedeiro, tais como bactérias, fungos e/ou vírus que podem estar alojados externamente ou internamente no explante a ser inoculado. Se estes microrganismos não forem controlados, eles poderão contaminar o meio de cultivo e o material em contato com o explante, inviabilizando a micropropagação (BARRUETO CID e JORDAN, 2006). Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo liberar no meio, metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000).

A desinfestação de explantes antes da introdução *in vitro* é essencial para remover os contaminantes da superfície, ou seja, microrganismos exógenos, tais como bactérias e esporos fúngicos que poderão comprometer a fase de estabelecimento *in vitro* (DAVEY e ANTHONY, 2010). Os tratamentos desinfestantes devem ser eficientes para remover os contaminantes, com o mínimo de danos para as células da planta (DAVEY e ANTHONY, 2010). O sucesso do estabelecimento de culturas assépticas é essencial para prosseguir com as outras etapas da micropropagação (RIBAS *et al.*, 2003).

Os produtos mais utilizados para preparo de soluções desinfestantes são: álcool etílico a 70% (v/v), hipoclorito de sódio (NaOCl) em concentração que varia de 0,5 a 5% (v/v) ou hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) de 3 a 7% (p/v), cloreto de mercúrio (HgCl_2) e ácido clorídrico (HCl), preparados em solução aquosa (DAVEY e ANTHONY, 2010). O mecanismo de ação do cloro ativo não é bem conhecido, embora algumas hipóteses sugiram que há uma combinação com proteínas da membrana celular dos microrganismos, formando compostos tóxicos e levando à inibição das enzimas essenciais, provocando, assim, a necrose não só dos agentes infestantes mais também do material biológico (DOMINI *et al.*, 2005).

O cloreto de mercúrio (HgCl_2) é um esterilizante superficial muito eficaz, mas é extremamente tóxico para os seres vivos. Deve-se observar os cuidados para aplicação, utilização e descarte. A concentração do produto varia conforme a necessidade, mas a concentração mais utilizada para desinfestação de superfície é 0,1 a 0,2% (p/v) com tempo variando de 1 a 20 minutos,

dependendo do material a ser tratado (DAVEY e ANTHONY, 2010). O Tween 20®, composto a base de polioxietileno sorbitano monolaurato (FLORENCE e ATTWOOD, 2003) pode ser adicionado na solução desinfestante, 2 a 3 gotas por litro (DAVEY e ANTHONY, 2010), com o objetivo de facilitar o contato dos agentes esterilizantes com o explante, reduzindo a tensão superficial.

Para minimizar a contaminação por micro-organismos, um biocida de amplo espectro / fungicida para cultura de tecidos vegetais, o *Plant Preservative Mixture*® (PPM), composto de 5-Cloro-2-Metil-3(2H)-Isotiazolone e 2-Metil-3(2H)-Isotiazolone, pode ser adicionado ao meio a uma concentração de 2-20 mL.L⁻¹ (DAVEY e ANTHONY, 2010) ou, segundo o manual do fabricante, 1 a 2 mL.L⁻¹ no meio de cultura e, como tratamento desinfestante, solução com 20 a 40 mL.L⁻¹. Tem como objetivo evitar, de forma eficaz, ou pelo menos reduzir a contaminação microbiana. Algumas espécies de plantas são mais sensíveis ao PPM do que outras. O enraizamento em espécies de plantas menos tolerantes pode ser parcialmente inibido. Neste caso, os explantes devem ser expostos ao PPM por um período limitado (DAVEY e ANTHONY, 2010).

2.2.3 Meio de cultura

Os meios de cultura utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998). O meio de cultura deve suprir nutrientes essenciais ao crescimento de tecidos e órgãos vegetativos. Basicamente, o meio de cultura não fornece apenas macro e micronutrientes, também pode ser fonte de carboidratos, geralmente representados pela sacarose. Adicionalmente, visando o maior crescimento, incluem-se compostos orgânicos como: vitaminas, aminoácidos e reguladores vegetais. Porém, as concentrações desses compostos irão depender das respostas dos diversos materiais genéticos e condições ambientais (GEORGE *et al.*, 2008). O sucesso da cultura de tecidos como meio de propagação vegetal é fortemente influenciado pelo meio de cultura utilizado (GEORGE *et al.*, 2008).

O pH dos meios nutritivos em culturas de células vegetais é normalmente ajustado entre 5 e 6 (TORRES *et al.*, 1998). Para solidificar o meio nutritivo adiciona-se produto gelificante, como, por exemplo, ágar bacteriológico, que é alcalino, líquido à temperatura de 80°C e se solidifica a 40°C.

O carvão ativado é frequentemente adicionado aos meios de cultura de tecidos para melhorar o crescimento e desenvolvimento celular. Os efeitos do carvão ativado sobre a morfogênese podem ser principalmente devidos a sua capacidade de adsorção de substâncias tóxicas produzidas pelo explante. Acredita-se que o carvão ativado pode liberar gradativamente alguns produtos adsorvidos, como nutrientes e reguladores vegetais, tornando-os disponíveis para as plantas. Desempenha um papel importante na micropropagação, na germinação de sementes de orquídeas, embriogênese somática, cultura de anteras, produção de sementes sintéticas, cultura de protoplastos, enraizamento e alongamento do caule (THOMAS, 2008).

Na micropropagação têm sido utilizados diferentes tipos de meio de cultura. O meio WPM, *Wood Plant Medium* (LLOYD e McCOWN, 1981), desenvolvido para a propagação *in vitro* de espécies lenhosas teve pouco impacto no caso das espécies de *Acacia*. Vengadesan *et al.* (2002), citando outros trabalhos, afirmam que o meio MS de Murashige e Skoog (1962) foi o preferido para *A. salicina*, *A. saligna*, *A. sclerosperma*, *A. mangium*, *A. catechu*, *A. albida*, *A. mearnsii* e *A. sinuata* para indução de brotações, alongamento e indução de raízes.

Disarz e Corder (2009) testaram em segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro* de *A. mearnsii* diferentes meios de cultura: B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), SP (BARRUETO-CID e DURZAN, 2003) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1981). Como o MS promoveu a maior multiplicação de gemas (3,7 gemas/segmento nodal) aos 30 dias, foram testadas diversas concentrações do meio MS: $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ e 1/1 (concentração original), $\frac{5}{4}$, $\frac{3}{2}$, $\frac{7}{4}$ e $\frac{2}{1}$, com e sem carvão ativado. Entre as concentrações de macronutrientes do meio MS, a diluição para $\frac{3}{4}$ da concentração original com a adição de carvão ativado apresentou as melhores respostas para a multiplicação de gemas axilares de acácia-negra (7,7 gemas/segmento nodal) aos 60 dias (DISARZ e CORDER, 2009).

A adição de carvão ativado no meio de cultura MS a $\frac{3}{4}$ de sais melhorou a taxa de multiplicação das microestacas de acácia negra, reduziu a clorose das folhas e promoveu o alongamento dos explantes (QUOIRIN *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados por Disarz e Corder (2009), que relatam que na presença de carvão ativado no meio de cultura, os índices de clorose e de presença de calos foram significativamente menores e sintomas como o raquitismo e a necrose foliar não apareceram. A presença de carvão ativado proporcionou a formação de raízes nos demais explantes.

2.2.4 Reguladores Vegetais

Reguladores vegetais ou fitohormônios são mensageiros químicos que modulam os processos celulares, interagindo com proteínas específicas, presentes na planta em baixas concentrações. O desenvolvimento vegetal é regulado por seis tipos principais de fitohormônio: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido absísico e brassinosteróides (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Citocininas (BAP, BA, cinetina, 2-iP, zeatina) são adicionadas ao meio de cultura para induzir brotações axilares, as auxinas (2,4-D, ANA, AIA, AIB) para induzir a formação de calos, e AIB é geralmente utilizado para indução de raízes adventícias. Giberelinas e poliaminas adicionadas ao meio promovem alongamento dos explantes (DAVEY e ANTHONY, 2010).

As auxinas foram o primeiro tipo de fitohormônio descoberto em plantas, sendo utilizadas comercialmente na agricultura e horticultura a mais de 50 anos. A auxina mais comum de ocorrência natural é o ácido indol-3-acético (AIA) que é sintetizado nos ápices de caules e de raízes (TAIZ e ZEIGER, 2009). O ácido indolbutírico (AIB) é a auxina mais empregada, não é tóxico para a maioria das plantas e é relativamente estável (PIRES *et al.*, 2013).

As auxinas têm como principal função nos vegetais superiores a regulação do crescimento por alongamento de caules jovens e coleóptilos. Em baixos níveis atuam no alongamento de raízes, em altas concentrações inibem o crescimento deste órgão (TAIZ e ZEIGER, 2009). Também estão envolvidas no controle da diferenciação celular (KERBAUY, 2004). Participam na regulação da dominância apical, da iniciação das raízes laterais, da abscisão foliar, da

diferenciação vascular, da formação de gemas florais, da filotaxia e do desenvolvimento do fruto (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Nos vegetais, as auxinas e as citocininas estimulam a proliferação de vários tipos de células. São os fitohormônios mais importantes para a regulação do crescimento e da morfogênese na cultura de tecidos (GEORGE *et al.*, 2008). Nos tecidos como folha, raiz ou caule, a presença destes reguladores no cultivo *in vitro*, em concentrações adequadas, promove a formação de massas celulares, chamadas de calos, e ainda de gemas ou raízes (KERBAUY, 2004).

Vários fatores influenciam a taxa de expansão/alongamento da parede celular. Fatores internos, como o tipo de célula, sua idade e a presença de auxina e giberelina aliados a fatores ambientais como disponibilidade de água, luz, temperatura agem modificando certas propriedades da parede celular. O controle da expansão celular é essencial para os processos morfogênicos nos vegetais (KERBAUY, 2004). A composição e concentração de reguladores vegetais no meio de cultura podem determinar o padrão de crescimento e desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (CALDAS *et al.*, 1998).

Os efeitos das diferentes concentrações de auxinas ou outro regulador vegetal na cultura de tecidos devem ser testados para cada caso individualmente e os resultados, até certo ponto, podem ser transferidos para outras culturas. A concentração de cada tipo de regulador vegetal difere de acordo com o tipo de planta a ser cultivada, dos compostos utilizados e das interações entre as substâncias combinadas (GEORGE *et al.*, 2008).

Na fase de multiplicação, baixa concentração de auxina somada com alto nível de citocinina é muitas vezes benéfica para indução de gemas. Em alguns casos somente a citocinina é suficiente para indução de brotações. Tratamento bem sucedido induz várias brotações em um período de 4 a 6 semanas. Concentrações muito altas de citocinina podem gerar pequenos brotos que não conseguem se alongar, formar folhas com formato incomum, anormal, e/ou hiperídricas (GEORGE *et al.*, 2008). Várias auxinas e citocininas têm sido descritas para regeneração e indução de múltiplas brotações para espécies de *Acacia*. A mais utilizada na etapa de multiplicação *in vitro* é 6- benzilaminopurina (BAP), individualmente ou combinada com outras citocininas como a zeatina, cinetina (VENGADESAN *et al.*, 2002). O melhor resultado para formação de

gemas entre as citocininas testadas em explantes cotiledonares de *Acacia nilotica* foi BAP a $1,5 \text{ mL}^{-1}$ (DEWAN, NANDA e SHRISH, 1992). Segundo Quoirin (2003) para a fase de multiplicação, BAP é a citocinina mais utilizada para espécies de *Acacia*, às vezes combinada com AIA, GA₃ ou ANA. A indução de enraizamento geralmente requer um ajuste dos níveis de auxinas e citocininas. A rizogênese é geralmente obtida através de tratamento com auxina (GEORGE *et al.*, 2008).

As giberelinas constituem uma família de compostos definidos por sua estrutura. Afetam vários aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal, mas são mais conhecidas pelo efeito no alongamento dos entrenós de algumas plantas (TAIZ e ZEIGER, 2009). A giberelina mais utilizada na micropropagação é o ácido giberélico (GA₃). Produz efeito similar ao das auxinas, mas em alguns gêneros pode ser mais eficaz. Na fase de introdução *in vitro*, pode melhorar o estabelecimento de certas plantas, pois auxilia no crescimento e desenvolvimento da parte aérea. A adição de GA₃ ao meio de cultura muitas vezes diminui ou impede a formação de raízes adventícias, brotos ou embriões somático. Na fase de alongamento, o tratamento com GA₃ pode ser benéfico quando, na multiplicação, citocinina foi utilizada e obteve-se brotações muito pequenas (GEORGE *et al.*, 2008).

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, G. B. **Miniestaquia de *Pinus taeda* L.** 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Programa de pós-graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). **Anuário estatístico da ABRAF 2013:** ano base 2012. Brasília: ABRAF, 2013. 149 p.
- BARRUETO-CID, L. P.; DURZAN, D. J. **Efeito da cefotaxima na germinação, crescimento e brotação de gemas axilares, sob condições *in vitro*.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 35p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 49).
- BECK, S. L.; DUNLOP, R.; van STADEN, J. Rejuvenation and micropropagation of *Acacia mearnsii* De Wild. using coppice material. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p.149-153, 1998.
- BOLAND, D.J.; BROOKER, M.I.H.; CHIPPENDALE, G.M.; HALL, N.; HYLAND, B.P.M.; JOHNSTON, R.D.; KLEINING, D.A.; TURNER, J.D. **Forest Trees of Australia.** Melbourne: Nelson-CSIRO, 1984.
- BOLAND, D.J. Genetic resources and utilization of Australian bipinnate acacias (Botrycephalae). In: AUSTRALIAN ACACIAS IN DEVELOPING COUNTRIES: INTERNATIONAL WORKSHOP, 1986, Gympie. **Proceedings...** Canberra: ACIAR, 1986. p. 29-37.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, v. 1.** Brasília: Embrapa/CNPH, 1998. p. 87-132.
- CARVALHO, D.; PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura “in vitro” de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 97-106, 1990.
- DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture: essential methods.** Chichester, UK: Willey-Blackwell, 2010. 359 p.
- DEWAN, A.; NANDA, K; SHRISH, G. C. In vitro micropropagation of *Acacia nilotica* subsp. *indica* Brenan via cotyledonary nodules. **Plant Cell Reports**, Delhi, India, v.12, p. 18-21, 1992.
- DISARZ, R.; CORDER, M. P. M. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* De Wild. sob diferentes meios de cultura. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, p. 599-606, 2009.

DOMINI, L.P.; FERREIRA-MOURA, I.; GUISSO, A.P.; SOUZA, J.A. de.; VIÉGAS, J. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 517-522, 2005.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**, v.4. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. 710 p.

FRAMPTON, L. J. Jr.; HODGES, J. F. Nursery rooting of cuttings from seedlings of slash and loblolly pine. **Southern Journal Applied Forestry**, v. 13, p.127-132, 1989.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soyabean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, n.1, p.151-158, 1968.

GEORGE, E. F.; HALL, M. H.; DE KLERK, G. J. (eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture**, v. 1. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. 501p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M, A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v. 1. Brasília: Embrapa/CNPH, 1998. p. 183-260.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR.F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: principles and practices**. 7th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

HUANG, F. H.; AL-KHYRI, J. M.; GBUR, E. E. Micropropagation of *Acacia mearnsii*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.30, p. 70-74, 1994.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452p.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Proceedings - International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1981.

MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação *in vitro*. **ABTCP Notícias**, n. 36, p. 5-10, 2000.

MORA, A. L. **Aumento da produção de sementes geneticamente melhoradas de *Acacia mearnsii* de Wild. (acácia-negra) no Rio Grande do Sul**. 2002. 140 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, H. A. **Acacia negra e tanino no Rio Grande do Sul, v. 1**. Porto Alegre: Tipografia Mercantil, 1960.

PIRES, P. P.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. Ácido indolbutírico e ortotropismo na miniestaquia de *Araucaria angustifolia*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, n.3, p.393-399, 2013.

QUOIRIN, M.; SILVA, M. C. MARTINS, K. G.; OLIVEIRA, D. E. Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 66, n. 3, p. 199-205, 2001.

QUOIRIN, M. Micropropagation of *Acacia* species. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Dordrecht; Boston: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 245-268.

READ, P. E.; FELLMAN, C. D. Accelerating acclimation of in vitro propagated woody ornamentals. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 166, p.15-20, 1985.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 115-122, 2003.

ROVERSI, T.; MATTEI, V.; SILVEIRA JR., P.; FALCK, G. Superação da dormência em sementes de acácia negra (*Acacia mearnsii* Willd.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 2, p. 161-163, 2002.

SCHNEIDER, P. R.; FLEIG, F. D.; FINGER, C. A. G.; KLEIN, J.E.M.; Crescimento da acácia-negra, *Acacia mearnsii* De Wild em diferentes espaçamentos. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 10, n. 2, 2000.

SILVA, A. B. DA; PASQUAL, M. ; MACIEL, A. L. DE R.; DUTRA, L. F. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de glaxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n. 2, p. 255-260, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 618-631, 2008.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, v. 1**. Brasília: Embrapa/CNPH, 1998.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, v. 2**. Brasília: Embrapa/CNPH, 1999.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; AMUTHA, S.; SELVARAJ, N. In vitro propagation of Acacia species a review. **Plant Science**, v. 163, p. 663-671, 2002.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 272p.

3 CAPÍTULO 1 - DESINFESTAÇÃO E INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE *Acacia mearnsii* De Wild.

RESUMO

A dificuldade em produzir clones por estaquia, em função das baixas taxas de enraizamento, constitui um empecilho para o uso desta técnica. Surge, então, a necessidade de se desenvolver protocolos de micropropagação *in vitro* para multiplicação de genótipos superiores selecionados, visando aprimorar o melhoramento genético da espécie para plantios florestais. O objetivo destes ensaios foi a definição de um protocolo de desinfestação para introdução *in vitro* de segmentos nodais de clones selecionados de *Acacia mearnsii*. A desinfestação de propágulos, provenientes de jardim clonal, foi realizada combinando diferentes produtos e concentrações (álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio, ácido clorídrico, PPM (*Plant Preservative Mixture*), cloreto de mercúrio) e tempo de imersão (10 segundos a 8 horas). As avaliações foram feitas aos 7, 15 e 30 dias. O meio de cultura utilizado em todos os experimentos foi o MS $\frac{3}{4}$ dos sais (Murashige e Skoog, 1962), com ou sem adição de 2 g. L⁻¹ de carvão ativado. Todos os testes foram submetidos a análise estatística (Teste de Homogeneidade das variâncias (Levene), ANOVA, teste de médias (Tukey ou Bonferroni a 5%) usando o programa IBM SPSS Statistics 19 ®. O tratamento de desinfestação que obteve maior sucesso foi a combinação de álcool etílico 70%, cloreto de mercúrio a 0,4%, hipoclorito de sódio a 2%, com 80% de sobrevivência, mas não houve desenvolvimento de novas gemas. A taxa de sobrevivência dos explantes, após 30 dias, foi baixa em função da necrose ou contaminação por fungos e/ou bactérias.

Palavras-chave: *Acacia* negra. Estabelecimento *in vitro*. Micropropagação.

ABSTRACT

DISINFECTION AND *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF NODAL SEGMENTS OF *Acacia mearnsii* De Wild.

Acacia mearnsii De Wild., known as black wattle, is a native forest tree of Australia. This species is established mainly from seedlings produced by seeds. This fact leads to variability between individuals of a population and it can affect the productivity of the forest. Due to low rates of rooting it is difficult to propagate some selected clones by cuttings. This fact raises the need to develop micropropagation protocols for *in vitro* multiplication of superior genotypes, aiming to improve the rooting ability of the species. The purpose of this study was to define a protocol for disinfection of nodal segments before *in vitro* introduction. Combination of concentrations of different products (70% ethyl alcohol, sodium hypochlorite, hydrochloric acid, PPM (Plant Preservative Mixture), mercuric chloride) and immersion times (10 seconds to 8 hours) were tested. Assessments were made at 7, 15 and 30 days. The culture medium used in all experiments was the complete MS (Murashige and Skoog, 1962) with $\frac{3}{4}$ strength salts, with or without activated charcoal. All tests were subjected to statistical analysis. Homogeneity of variances was verified using Levene, treatments were compared using ANOVA, and Tukey or Bonferroni tests (5%). All analysis were performed using IBM SPSS Statistics 19 ® program. The best disinfection treatment (80% survival at 15 days) was the combination of 70% ethanol, 0.4% mercuric chloride, sodium hypochlorite at 2%. However, there was no development of new buds and the survival rate of the explants after 30 days was low, due to necrosis or contamination by fungi and/or bacteria.

Keywords: Black wattle. *In vitro* establishment. Micropropagation.

3.1 INTRODUÇÃO

Acacia mearnsii De Wild., Fabaceae, conhecida como acácia negra é natural da Austrália. No Brasil, o gênero *Acacia* ocupa uma área de 148.311 ha (ABRAF, 2013), sendo a maioria povoamentos de acácia negra. A madeira é utilizada para energia, carvão, cavaco para celulose e painéis. Da sua casca é retirado tanino, utilizado em diversos setores industriais (ABRAF, 2013). Mediante o melhoramento genético desta espécie, deseja-se produzir clones dos materiais genéticos superiores para as características selecionadas, mas existe dificuldade de enraizamento das estacas de alguns indivíduos selecionados.

O rejuvenescimento do material pode ser a solução para este material se tornar responsivo na fase de enraizamento. Na silvicultura clonal de *Eucalyptus*, a micropropagação pela proliferação de gemas axilares tem sido utilizada com êxito no rejuvenescimento de clones selecionados, visando à melhoria do processo de propagação de mudas por microestaquia (XAVIER e OTONI, 2009).

A propagação *in vitro* está entre as técnicas da biotecnologia vegetal com maior interesse científico e econômico, sendo a técnica de micropropagação mais difundida entre as espécies florestais e com aplicações comprovadas nesse setor (XAVIER *et al.*, 2007).

Entre os principais inconvenientes encontrados na produção de mudas de espécies florestais pela micropropagação aparece a recalcitrância de várias espécies ao cultivo *in vitro* e a contaminação do material por microrganismos, principalmente bactérias endógenas, representando sérias limitações para obtenção de um número suficiente de culturas assépticas que permitam dar prosseguimento ao cultivo *in vitro* (XAVIER e OTONI, 2009). Isso se verifica em função da frequente presença de microrganismos associados aos explantes e da relativa ineficiência dos procedimentos de desinfestação superficial que costumam ser empregados com sucesso em espécies herbáceas (GOLLE *et al.*, 2013).

Várias são as substâncias de ação germicida que podem ser empregados nos procedimentos de desinfestação do material vegetal para posterior inoculação, como: etanol, compostos a base de cloro (hipoclorito de sódio e de cálcio), cloreto de mercúrio, cloreto de benzalcônio, peróxido de

hidrogênio (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), ácido clorídrico e *Plant Preservative Mixture*® (DAVEY e ANTONY, 2010). Contudo, se deve elaborar uma metodologia para o uso dos produtos químicos durante os procedimentos de desinfestação, determinando tempo e concentração adequada para maior eficácia no controle das contaminações, com menores danos possíveis aos explantes utilizados, garantindo o sucesso no estabelecimento *in vitro*.

O objetivo geral deste trabalho foi introduzir segmentos nodais de *Acacia mearnsii in vitro*, obtendo uma cultura asséptica e material responsivo para multiplicação dos clones selecionados.

Os objetivos específicos foram testar:

- a) efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) e do cloreto de mercúrio (HgCl_2) na desinfestação de segmentos nodais;
- b) efeito do *Plant Preservative Mixture* (PPM®) no meio de cultura e como solução desinfestante em diferentes tempos de imersão;
- c) efeito do ácido clorídrico (HCl) sozinho ou combinado com HgCl_2 ou NaOCl.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de realização dos experimentos

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal (LAMEF), Departamento de Ciências Florestais (DECIF) na Universidade Federal do Paraná.

3.2.2 Preparo das cepas no jardim clonal

Os testes de desinfestação foram realizados com material vegetal proveniente de um jardim clonal, mantido em casa de vegetação, com material genético selecionado, constituído por 11 clones diferentes e cepas formadas por

mudas provenientes de semente, fornecido pela empresa TANAGRO®. As cepas foram acondicionadas em vasos de 5 L com substrato Maxplant® e receberam fertirrigação semanal com solução nutritiva proposta por Bolle Jones (1954) durante o primeiro ano e depois foi substituída por solução nutritiva preparada com produtos comerciais Kristalon® (NPK 18 18 18) como fonte de macronutrientes e Rexolin BRA®, de micronutrientes. As cepas foram mantidas podadas para se obter brotações novas e, antes da coleta das brotações axilares, receberam tratamento com fungicida Cercobin® (0,2% p/v).

Os explantes, segmentos nodais, foram padronizados com aproximadamente 10 mm de comprimento para experimento em tubos de ensaio de vidro, medindo 20 mm de diâmetro por 150 mm de altura e tampa de polietileno, contendo 10 ml de meio de cultura semi sólido ou 4 mm para experimento utilizando tubos de ensaio de mesmo tamanho, com 15 ml de meio de cultura líquido e ponte de papel.

3.2.3 Desinfestação e introdução *in vitro* de *Acacia mearnsii*

Para estabelecimento *in vitro* de *Acacia mearnsii* testou-se várias soluções desinfestantes como: hipoclorito de sódio (NaOCl); cloreto de mercúrio (HgCl₂); *Plant Preservative Mixture*® (PPM) e ácido clorídrico (HCl). O álcool etílico 70% e fungicida Cercobin® também foram utilizados como solução desinfestantes.

Após cada imersão em produto desinfestante, os explantes foram enxaguados em água destilada e autoclavada por 3 vezes. Todo o procedimento de desinfestação foi realizado dentro da câmara de fluxo laminar, previamente desinfestada com álcool etílico 70% e luz ultravioleta por 20 minutos. As placas de Petri, as pinças e bisturis utilizados foram previamente higienizados com água e sabão neutro, passados em água destilada, embalados em papel e esterilizados em autoclave a 121°C e 1,1 Kgf.cm⁻² de pressão por 40 minutos.

Os tubos de ensaio utilizados na fase de estabelecimento de culturas assépticas possuíam 15,0 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, com capacidade

de 50 ml, contendo aproximadamente 10 ml de meio de cultura cada e tampados com tampas de polipropileno.

O meio nutritivo utilizado em todas as etapas foi o MS com sais reduzidos a $\frac{3}{4}$, vitaminas e compostos orgânicos do mesmo meio, 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7,5 g.L⁻¹ de ágar bacteriológico (Himedia®). O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8 \pm 2 com NaOH ou HCl 0,1N e esterilizado em autoclave a 121°C e 1,1 Kgf. cm⁻² de pressão por 20 minutos.

Os explantes foram inoculados na posição vertical. Permaneceram na sala de crescimento com temperatura de 25 \pm 2°C, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 2800 lux, proporcionada por lâmpadas fluorescente, tipo “luz do dia”, de 30 W.

As variáveis mensuradas foram contaminação por fungos, por bactérias, presença de necrose (explante com cor marrom em sua totalidade ou em grande parte) e % de sobrevivência (explantes que não estavam contaminados e apresentavam coloração verde). As avaliações, havendo sobreviventes, foram realizadas aos 7, 12 ou 15, 30 e 50 dias. Os explantes que estavam apresentando necrose permaneciam na sala de crescimento até o término do experimento.

3.2.3.1 Efeito do hipoclorito de sódio e do cloreto de mercúrio na assepsia de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*

As soluções de hipoclorito de sódio foram preparadas diluindo, com água destilada (v/v), solução concentrada a 12% de cloro ativo (Cloroquímica®). O cloreto de mercúrio (Labsynth®, 99,5% de pureza) foi pesado (p/v) conforme a concentração desejada, diluído em água destilada e após o uso, foi neutralizado com sulfeto de sódio nonahidratado (Na₂S.9H₂O) que reage com o HgCl₂ formando um precipitado. Para cada 100 g de resíduo a 0,5% usou-se 5 g de sulfeto de sódio. Este material ficou separado para recolhimento como descarte especial, conforme as instruções do Departamento de Gestão Ambiental (DGA) da UFPR.

A assepsia de segmentos nodais de *Acacia mearnsii* foi realizada utilizando diferentes tratamentos. Em testes preliminares, 5 experimentos de

desinfestação para introdução *in vitro* destes explantes foram estabelecidos (TABELA 1).

TABELA 1: RESUMO DOS TRATAMENTOS PRELIMINARES DE DESINFESTAÇÃO PARA INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE *Acacia mearnsii*.

^{*1} Exp.	^{*2} Trat.	Álcool etílico	^{*3} T (seg)	Cercobin® %	^{*4} T (min)	HgCl ₂ %	^{*4} T (min)	NaOCl %	Tempo (min)	^{*5} Nº Expl./Trat.	^{*6} Delineam. Exp.
1	1			0,2	15			1	10	40	DIC
	2							2			
2	1	70%	20	0,2	15	0,1	15	1	15	40	
3	1	70%	15	0,2	15	0,5	15	1	15	40	DIC
	2							2			
4	1			0,2	15	0,5	15	2	15	80	
5	1	70%	15	0,2	15			1,5	15	80	DIC
	2							3			

NOTA: ^{*1} Exp.: experimentos; ^{*2} Trat.: tratamentos; ^{*3} T (seg): tempo em segundos; ^{*4} T (min): tempo em minutos; ^{*5} Nº Expl./ Trat.: número de explantes por tratamento; ^{*6} Delineam. Exp.: delineamento experimental.

FONTE: o autor, 2013.

Com os resultados obtidos nestes testes preliminares (TABELA 1), montou-se um experimento trifatorial (2x2x3), sendo diferentes concentrações de NaOCl (2 ou 3%) por 10 minutos, seguido de HgCl₂ (0,25 ou 0,4%) por 5, 10 ou 15 minutos (TABELA 2). Os explantes foram mergulhados em álcool etílico 70% por 10 segundos e em solução com Cercobin® 0,2% (p/v) por 10 minutos para então serem submetidos aos diferentes tratamentos com hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio. Após cada solução desinfestante utilizada, os explantes foram enxaguados por três vezes em água destilada e autoclavada. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), trifatorial 2x2x3 (12 tratamentos), com quatro repetições e cinco explantes por parcelas (totalizando 20 explantes por tratamento).

TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES DE NaOCl e HgCl₂ TESTADOS E TEMPOS DE IMERSÃO NO HgCl₂.

Experimento	Tratamentos	NaOCl 10' (%)	HgCl ₂ (%)	Tempo (min)
6	1	2	0,25	5
	2			10
	3			15
	4		0,4	5
	5			10
	6			15
	7	3	0,25	5
	8			10
	9			15
	10		0,4	5
	11			10
	12			15

FONTE: o autor, 2013.

O melhor tratamento até então testado foi utilizado para testar com explantes de tamanho reduzido (4 mm) em meio de cultura líquido e ponte de papel filtro, gramatura 220 g/m², confeccionado com o formato de “M”, onde o explante foi inoculado na posição vertical, utilizando o papel como apoio (Exp.7, TABELA 3). Os experimentos 8 e 9 foram de segmentos nodais com 10 mm, em meio de cultura semi sólido. As soluções para estes testes foram álcool etílico a 70% por 10 segundos, HgCl₂ a 0,4% (p/v) por 15 minutos e NaOCl a 2 e 3 % (v/v) por 10 e 15 minutos para desinfestação de segmentos nodais, o delineamento experimental foi de blocos ao acaso (DBC), com 5 blocos e 4 plantas por parcelas (TABELA 3).

TABELA 3 - HgCl₂ COMBINADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaOCl NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Acacia mearnsii*

Exp.	Trat.	Álcool etílico	Tempo (seg)	HgCl ₂ %	Tempo (min)	NaOCl %	Tempo (min)	² Nº Expl./Trat.	Delineamento Experimental
*17	1	70%	10	0,4	15	2	10	40	
8	1	70%	10	0,4	15	2	15	40	DBC
	2					3	10		
9	1	70%	10	0,4	15	2	10	40	DBC
	2					3			

NOTA: *17 Teste com explantes de 4mm, em meio de cultura líquido sobre ponte de papel. ²Nº Expl./Trat.: número de explantes por tratamento.

Fonte: o autor, 2013.

3.2.3.2 Efeito do *Plant Preservative Mixture* (PPM®) utilizado como solução desinfestante e adicionado ao meio de cultura

A solução de PPM® foi preparada conforme as instruções do fabricante, que define como ideal para desinfestação e introdução *in vitro*, 40 ml.L⁻¹ do produto por quatro a doze horas. Acrescentou-se 1 ou 2 ml.L⁻¹ no meio de cultura. Foram realizados experimentos testando 4, 6 e 8 horas de imersão na solução e, após a verificação dos resultados, testou-se 1, 2, 3 e 4 horas com 1 ml.L⁻¹ de PPM® no meio de cultura (TABELA 4).

TABELA 4 - DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM SOLUÇÃO DESINFESTANTE COM PPM® E 1 OU 2 ml.L⁻¹ NO MEIO DE CULTURA.

Tratamentos	PPM® meio	PPM®	Tempo (h)	* N° Expl/Trat	Delineamento Experimental
1	1 ml.L ⁻¹	40 ml.L ⁻¹	4	80	DBC
2	2 ml.L ⁻¹		4		
3	1 ml.L ⁻¹		6		
4	2 ml.L ⁻¹		6		
5	1 ml.L ⁻¹		8		
6	2 ml.L ⁻¹		8		
1	1 ml.L ⁻¹	40 ml.L ⁻¹	1	56	DBC
2			2		
3			3		
4			4		

NOTA: * N° Expl./Trat.: número de explantes por tratamento.

FONTE: o autor, 2013.

O delineamento experimental para o experimento testando 4, 6 e 8 horas de imersão na solução com PPM® foi de blocos ao acaso, com 8 blocos e 10 explantes/parcela. De 1 a 4 horas de imersão, foi blocos ao acaso com 7 blocos e 8 explantes/parcela.

3.2.3.3 Efeito do uso de ácido clorídrico sozinho ou combinado com cloreto de mercúrio ou hipoclorito de sódio para desinfestação de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*

O ácido clorídrico (HCl) foi preparado com água destilada e a quantidade adicionada do HCl ocorreu por ajuste do pH da solução final a $3,5 \pm 0,02$. No primeiro experimento com este produto, utilizou-se álcool etílico a 70% por 10 segundos e diferentes tempos (5, 10, 15 e 20 minutos) em imersão na solução de HCl (pH 3,5). Estes explantes foram inoculados em meio de cultura semi

sólido com adição de 1 mL.L⁻¹ de PPM®. Foram arranjados em blocos ao acaso com 7 blocos e 10 plantas por parcelas (TABELA 5).

Posteriormente, testou se 10 e 15 minutos em imersão na solução de HgCl₂ a 0,3% (p/v), sozinho ou combinado com soluções de NaOCl 2% (v/v) por 10 minutos ou HCl pH 3,5 por 2 minutos. Foram arranjados em blocos ao acaso com 5 blocos e 8 plantas por parcela (TABELA 5).

TABELA 5 - EXPERIMENTOS COM SOLUÇÃO DESINFESTANTES DE HCl SOZINHO E HgCl₂ SOZINHO OU COMBINADO COM NaOCl OU HCl.

^{*1} Trat.	Álcool Etílico	^{*2} T (seg)	HgCl ₂ (%)	^{*3} T (min)	NaOCl (%)	^{*3} T(min)	HCl	^{*3} T (min)	PPM® meio	^{*4} Nº Expl./Trat.	^{*5} Delineam. Exp.
1								5			
2	70%	10					pH 3,5	10	1 mL.L ⁻¹	70	DBC
3								15			
4								20			
1				10							
2				15							
3	70%	10	0,3	10	2	10				40	DBC
4				15							
5				10			pH 3,5	2			
6				15							

NOTA: ^{*1}Trat.: tratamentos; ^{*2}T (seg): tempo de imersão em segundos; ^{*3}T (min): tempo de imersão em minutos; ^{*4} N° Expl./Trat.: número de explantes por tratamento; ^{*5} Delineam. Exp.: delineamento experimental.

FONTE: o autor, 2013.

3.2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os delineamentos utilizados foram inteiramente casualizados (DIC) ou blocos casualizados (DBC) com 20 a 80 explantes por tratamento.

Análises estatísticas foram realizadas com dados coletados aos 12 ou 15 e/ou 30 dias de introdução *in vitro*, das variáveis: contaminação por fungos, bactérias, necrose e porcentagem de sobrevivência.

Cada experimento foi submetido a um teste de normalidade, de homogeneidade (Levene), análise de variância (ANOVA) e, conforme a necessidade, teste de médias, Bonferroni (para arranjos fatoriais) ou Tukey a 5% de significância, usando programa IBM SPSS Statistic19®.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito do hipoclorito de sódio e do cloreto de mercúrio

Em experimentos preliminares, os tratamentos utilizando álcool etílico 70% e hipoclorito de sódio em diversas concentrações e tempos não foram eficientes para estabelecer uma cultura *in vitro* livre de micro-organismos (fungos e bactérias). A taxa de contaminação apresentada nos primeiros dias, logo após a inoculação do explante, foi de 100% no experimento 1 (TABELA 6). Em alguns tubos havia presença de fungos e de bactérias. O experimento foi encerrado após uma semana. Os ensaios (exp.1 e 5) testando diferentes concentrações de NaOCl (1, 1,5, 2 e 3% (v/v), sem adição de HgCl₂ ou com solução a 0,1% (p/v), resultaram em altas taxas de contaminação por fungos (77 a 100%) nos primeiros 15 dias de introdução *in vitro* (TABELA 6).

A adição da solução de cloreto de mercúrio (0,1; 0,5% p/v) com o objetivo de diminuir esta contaminação também não foi eficiente. A taxa de contaminação, com solução a 0,1% p/v, continuou alta (TABELA 6 - Exp.2). Com solução a 0,5% (p/v) a taxa de contaminação (fungos e bactéria) era em torno de 40% aos 15 dias (TABELA 6 - Exp.3 e 4), mas após este período houve muita perda pela necrose dos explantes. No experimento 3 (TABELA 6), a taxa de contaminação por fungos e bactérias foi menor pois utilizou-se alta concentração de cloreto de mercúrio (0,5% p/v), mas não houve sucesso no estabelecimento pois os explantes não desenvolveram novas gemas, apresentaram necrose e após 50 dias de introdução *in vitro* não havia nenhum sobrevivente.

TABELA 6 - RESULTADOS DOS TESTES PRELIMINARES DE DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Acacia mearnsii*.

Exp	Trat.	Aval. (dias)	Fungos(%)	Bact. (%)	Necrose (%)	Sobrev. (%)
1	1	7	100	75	21	0
	2		100	69	36	0
2	1	10	77	60	24	0
3	1	15	18	18	23	43
	2		8	38	20	35
4	1	15	31	16	0	53
5	1	15	86	31	3	0
	2		81	21	3	0

NOTAS: *¹ Alc. et. = álcool etílico; *²T = tempo; *³Aval. = avaliação; *⁴Sobrev. = sobrevivência.

FONTE: o autor, 2013.

Domini *et al.* (2005) constataram maior incidência de contaminação nos explantes foliares de aráceas ornamentais tratados com NaOCl (2,0% de cloro ativo), do que os encontrados na concentração de 1,5% e justificou esse resultado pelo fato de que o aumento da concentração de cloro ativo faz com que ocorra o aumento de pH da solução desinfestante. Os mesmos autores citam Hirata e Mancini Filho (2002), segundo os quais a faixa ideal de pH para a solução de hipoclorito de sódio a ser utilizada como desinfestante fica entre 5 e 8%, pois o aumento de pH propicia o desenvolvimento de mecanismos de defesa das bactérias, permitindo que se desenvolvam mesmo em concentrações altas de cloro ativo, assim dificultando a ação do produto. O problema encontrado pelo autor pode ser semelhante ao que ocorreu neste trabalho, pois apesar de aumentar a concentração do produto, não teve o resultado esperado de melhor controle de contaminações.

Alguns autores obtêm explantes assépticos com o uso de solução de hipoclorito de sódio sem a necessidade do uso do cloreto de mercúrio. Moraes *et al.* (2007) constataram decréscimo no número de gemas contaminadas com o aumento da concentração de hipoclorito de sódio e do tempo de exposição. Nas concentrações de NaClO a 2, 3 e 4%, obteve-se taxa de descontaminação total a partir de 15 minutos de exposição ao agente desinfestante. Segundo estes autores, o fato se deve provavelmente à ação germicida do hipoclorito de sódio, que apresenta uma melhor eficiência com o aumento do tempo de exposição. Domini *et al.* (2005) recomendam uma solução de NaClO com a menor

concentração possível de cloro ativo, para evitar danos ao tecido do explante. Piza *et al.* (2001) obtiveram 97,2% de descontaminação com uma solução de hipoclorito de sódio comercial (Q-Boa) diluído para 0,5% de princípio ativo; contudo, o número de gemas mortas foi considerado alto, em torno de 12,9%, as quais se apresentavam totalmente oxidadas. Bianchi *et al.* (2003) observaram que meristemas de marmeleiro imersos em hipoclorito de sódio a 1,5% por 10 minutos apresentaram o menor percentual de contaminação e as maiores taxas de sobrevivência. Para introdução *in vitro* de segmentos nodais de *Ilex paraguariensis*, Dutra *et al.* (2008) testaram hipoclorito de sódio na desinfestação dos explantes e relatam que foi parcialmente eficiente na descontaminação, mas o seu uso isolado não foi satisfatório para o estabelecimento em longo prazo devido à recontaminação principalmente por bactérias.

Fermino Jr. *et al.* (2009) estudaram a desinfestação de segmentos nodais apicais de plantas adultas de *Tectona grandis* durante o estabelecimento *in vitro* e observaram que os melhores tratamentos foram aqueles com mais de 15 minutos de exposição ao cloreto de mercúrio (0,1%) e aqueles com 30 minutos de exposição ao hipoclorito de sódio a 2,5 %. Entretanto, assim como no caso de acácia negra, nesses tratamentos com 15 minutos ou mais de exposição ao cloreto de mercúrio foram registradas as mais altas percentagens de oxidação e as mais baixas taxas de sobrevivência ao longo do tempo.

Para algumas espécies é importante a adição do cloreto de mercúrio na etapa de desinfestação. Por exemplo, para desinfestação e introdução *in vitro* de *Pfaffia tuberosa*, o tratamento indicado pelo autor foi álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio 1% e cloreto de mercúrio a 0,1% por 5 minutos (FLORES *et al.*, 2006). Para *Populus deltoides*, o melhor tratamento de desinfestação foi álcool 75% por 8 segundos e cloreto de mercúrio 0,1% por 3 minutos (LING *et al.*, 2013). Ribas *et al.* (2003), utilizando solução de hipoclorito de sódio a 0,25% durante 10 minutos obtiveram 71,53% de sobrevivência para a desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa, independente da época do ano (verão e outono). Porém, tratamento com cloreto de mercúrio a 0,05% por 10 minutos resultou em 84,10% de sobrevivência. Para *A. mearnsii*, tratamento com $HgCl_2$ a 0,1% não foi eficiente para a desinfestação de segmentos nodais provenientes

do mini jardim clonal do viveiro, pois em 10 dias havia 77% de contaminação por fungos.

No teste de duas concentrações de cloreto de mercúrio e três tempos de imersão nesta solução, a mais eficiente aos 12 dias foi a solução de 0,4% (p/v) por 15 minutos seguido de hipoclorito de sódio a 2% (v/v), com 30% de sobrevivência. Outro tratamento, consistindo da imersão em 0,4% de HgCl_2 seguido de hipoclorito de sódio a 3% (v/v) por 5 e 10 min, proporcionou 20 e 25% de sobrevivência (TABELA 7).

TABELA 7 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE IMERSÃO EM CLORETO DE MERCÚRIO SEGUIDO DE IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Acacia mearnsii* APÓS TRATAMENTO COM ÁLCOOL ETÍLICO 70% POR 15 SEGUNDOS E CERCOBIN® 0,2% POR 10 MINUTOS AOS 12 DIAS DE INTRODUÇÃO *IN VITRO*.

	Tempo (min)	NaOCl (2%)				NaOCl (3%)			
		Fungos (%)	Bact. (%)	Necrose (%)	Sobrev. (%)	Fungos (%)	Bact. (%)	Necrose (%)	Sobrev. (%)
HgCl_2 (0,25%)	5	55 ^{ns}	30 ^{ns}	0 ^{ns}	15 ^{ns}	60 ^{ns}	30 ^{ns}	0 ^{ns}	10 ^{ns}
	10	65 ^{ns}	40 ^{ns}	5 ^{ns}	0 ^{ns}	75 ^{ns}	50 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
	15	70 ^{ns}	25 ^{ns}	5 ^{ns}	0 ^{ns}	60 ^{ns}	35 ^{ns}	0 ^{ns}	5 ^{ns}
Média		63,3 b	31,7 a	3,3 a	5,0 b	65,0 b	38,3a	0,0 a	5,0b
C.V.(%)		8,0	12,6	54,5	7,6	7,8	10,4	-	7,6
HgCl_2 (0,40%)	5	60 ^{ns}	40 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}	35 ^{ns}	40 ^{ns}	5 ^{ns}	20 ^{ns}
	10	55 ^{ns}	40 ^{ns}	10 ^{ns}	0 ^{ns}	35 ^{ns}	40 ^{ns}	0 ^{ns}	25 ^{ns}
	15	40 ^{ns}	30 ^{ns}	10 ^{ns}	30 ^{ns}	30 ^{ns}	50 ^{ns}	25 ^{ns}	0 ^{ns}
Média		51,7 a	36,7 a	6,6b	10,0 a	33,3 a	43,3a	10,0 b	15,0 a
C.V.(%)		9,9	10,8	27,3	38,0	15,3	9,2	18,0	25,3

NOTAS: Médias seguidas de letra iguais, na coluna, não diferem estatisticamente. Na coluna: ^{ns} não significativo para variável tempo de imersão nas diferentes concentrações de HgCl_2 e NaOCl. Não há comparação estatística entre as linhas. *C.V.(%)= coeficiente de variação da média (ANOVA).

FONTE: o autor, 2013.

No experimento onde se testou diferentes concentrações de NaOCl e de HgCl_2 por 5; 10 e 15 minutos (TABELA 7), houve interação significativa (ANOVA) entre os três fatores para a variável sobrevivência, aos 7 dias ($p=0,004$) (ANEXO 1A). Não houve diferença estatística para as interações (12 e 30 dias), somente para concentrações de HgCl_2 na variável sobrevivência aos 12 dias ($p=0,035$) e aos 30 dias ($p=0,014$) e contaminação por fungos aos 12 ($p=0,006$) e 30 dias ($p=0,026$), sendo a concentração de 0,4% (v/v) de HgCl_2 mais eficiente pois houve menor contaminação por fungos (TABELA 7 e 8). Para taxa de explantes com necrose, o tempo de imersão na solução de HgCl_2 é significativamente

diferente aos 12 dias ($p=0,23$) e aos 30 dias ($p=0,043$), sendo essa taxa menor no tratamento de 5 minutos de imersão e estatisticamente diferente de 15 minutos (ANEXO 1B E 1C).

Os tratamentos com solução de NaOCl a 2 e 3% (v/v) não diferiram estatisticamente para nenhuma das variáveis avaliadas (TABELA 8). Os tratamentos com solução de HgCl_2 na concentração de 0,4% (v/v) foram superiores aos de 0,25% (v/v), comprovado pela diferença estatística, para variável contaminação por fungos e taxa de sobrevivência, nas observações aos 12 e 30 dias, sendo portanto este tratamento recomendado. Os resultados obtidos em três tempos de imersão na solução de HgCl_2 diferiram estatisticamente pela ANOVA e, submetendo os dados ao Teste de Bonferroni a 5% de probabilidade, observou-se que, após imersão de 5 minutos em HgCl_2 , a taxa de necrose foi significativamente menor ($p=0,043$) e diferiu da obtida após 15 minutos, que provocou a maior taxa de necrose (21,3%). Não houve diferença estatística entre as taxas obtidas após 5 e 10 minutos. Isso sugere que o aumento na concentração do desinfestante ou nos períodos de imersão, visando a melhorar a eficiência da desinfestação, deve ser cuidadosamente avaliado. Injúrias nos explantes, provocadas pela imersão em solução desinfestante, causam estresse e estimulam a atividade da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), relacionada à formação de compostos fenólicos (TAIZ e ZEIGER, 2004); conseqüentemente, provoca escurecimento do explante (necrose). Golle *et al.* (2013) constataram que maiores tempos de contato dos segmentos nodais de *Eugenia involucrata* com o hipoclorito de sódio provocaram injúrias nos explantes e, conseqüentemente, oxidação fenólica. Dutra *et al.* (2008) relatam que tratamentos com cloreto de mercúrio, em baixas concentrações (0,01%), não foram eficientes contra bactérias e causaram altas taxas de oxidação em maiores concentrações (até 0,5%) para segmentos nodais de *Ilex paraguariensis*. Isso demonstra a dificuldade de introduzir *in vitro* segmentos nodais de espécies lenhosas.

TABELA 8– EFEITO DE TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO APLICADOS EM SEGMENTOS NODAIS DE *Acacia mearnsii* AOS 30 DIAS DA INTRODUÇÃO *IN VITRO*.

	Tempo (min)	NaOCl (2%)				NaOCl (3%)			
		Fungos (%)	Bact. (%)	Necrose (%)	Sobrev. (%)	Fungos (%)	Bact. (%)	Necrose (%)	Sobrev. (%)
HgCl ₂ (0,25%)	5	55	50	5	0	60	30	15	5
	10	70	45	10	0	75	50	10	0
	15	65	30	15	0	60	40	10	5
Média		63,3b	41,7 a	10,0 a	0,0b	65,0b	40,0 a	11,7 a	3,33 b
*C.V.(%)		8,3	10,7	31,0	-	8,1	11,2	26,4	75,0
HgCl ₂ (0,40%)	5	70	60	5	5	35	40	5	20
	10	55	45	15	5	40	45	15	15
	15	45	45	20	10	35	55	40	0
Média		56,7 a	50,0 a	13,3 a	6,7 a	36,7 a	46,7 a	20,0 a	11,7a
*C.V.(%)		9,3	9,0	23,3	37,3	14,7	9,6	15,5	21,3

NOTAS: Médias seguidas de letra iguais, na coluna, não diferem estatisticamente. Para necrose, há diferença estatística entre 5 e 15 minutos de imersão no HgCl₂. Não há comparação estatística entre as linhas. *C.V.(%)= coeficiente de variação da média (ANOVA).

FONTE: o autor, 2013.

No experimento com explantes de 4 mm (TABELA 3, EXP.7) , havia 63% de sobrevivência após 15 dias(TABELA 9), mas não houve sobreviventes após 50 dias, pois a contaminação foi muito alta: 50% dos explantes com fungos, 45% com bactérias e 30% do total de explantes estavam necrosados (dados não mostrados).

Correia e Graça (1995) introduziram *in vitro* brotos apicais de *Acacia mearnsii*, com 9 meses de idade, tratados por imersão de 15 minutos em solução de fungicida Benomyl® (0,5 g.L⁻¹) seguida por detergente comercial em 3% v/v e NaOCl a 1% (v/v) com Tween 20 a 0,01% (v/v) sob agitação e constataram que a redução do tamanho do explante de 10 mm para 5 mm permitiu diminuir a contaminação de 80% para 10%. O mesmo não ocorreu neste experimento.

No segundo e terceiro teste (TABELA 9), utilizando explantes de 10 mm, a taxa de contaminação por fungos diminuiu, mas a contaminação por bactérias continuou alta. A taxa de sobrevivência aos 15 dias aumentou (TABELA 9), mas aos 30 dias os explantes que não estavam necrosados não emitiram gemas novas, mesmo adicionando citocinina (1,2 µM de BAP) ao meio de cultura para indução de brotações.

TABELA 9—EFEITO DO CLORETO DE MERCÚRIO E HIPOCLORITO DE SÓDIO NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Acacia mearnsii* COM TAMANHOS DE 4mm E 10 mm AOS 15 DIAS DE INTRODUÇÃO *IN VITRO*.

NaOCl (%)	T ¹ (min)	Tamanho expl.(mm)	Fungos (%)	Bactérias (%)	Necrose (%)	Sobrevivência (%)
2	10	4	25	5	8	63
2	15	10	3	30	3	65
3	10		0	15	5	80
2	10	10	6	21	3	71
3			5	15	0	80

NOTAS: Álcool etílico a 70% por 10 segundos, cloreto de mercúrio 0,4% (v/v) por 15 minutos. *¹T= tempo de imersão.

FONTE: o autor, 2013.

3.3.2 Efeito do PPM® utilizado como solução desinfestante e adicionado ao meio de cultura

Dados coletados com 15 dias de introdução *in vitro* de segmentos nodais de *A. mearnsii* (TABELA 10) mostram baixa taxa de sobrevivência. No primeiro experimento, as melhores taxas de sobrevivência foram obtidas após tempos 4 e 6 horas de imersão. A seguir, foi realizado outro teste onde avaliou-se menores tempos de imersão no produto. Os resultados do primeiro experimento foram diferentes do segundo para 4 horas, sem sobrevivência aos 15 dias de introdução *in vitro* (TABELA 10) para os tempos de 1 a 4 horas.

TABELA 10 - EFEITO DE TRATAMENTOS COM PPM (PLANT PRESERVATIVE MIXTURE®) APLICADOS A SEGMENTOS NODAIS DE *A. mearnsii* AOS 15 DIAS DA APLICAÇÃO.

* ¹ Exp.	PPM no meio	T ² (h)	Fungos (%)	Bact. ³ (%)	Necrose (%)	Sobrev. ⁴ (%)
1	1 ml. L ⁻¹	4	16	39	12	33
	2 ml. L ⁻¹	4	10	35	19	36
	1 ml. L ⁻¹	6	16	31	22	31
	2 ml. L ⁻¹	6	18	28	11	43
	1 ml. L ⁻¹	8	26	28	21	25
	2 ml. L ⁻¹	8	25	33	21	21
2	1 ml. L ⁻¹	1	93	48	38	0
		2	93	36	45	0
		3	86	45	39	0
		4	93	41	63	0

NOTAS: Solução de imersão com 40 ml.L⁻¹ de PPM. *¹Exp.= experimento; *²T= tempo; *³Bact.= bactérias; *⁴Sobrev.= sobrevivência.

FONTE: o autor, 2013.

Analisando estatisticamente os dados do primeiro experimento com PPM® (ANEXO 2), a diferença entre os resultados foi significativa para tempo de imersão no caso das variáveis “contaminação por fungos” e “taxa de necrose” (TABELA 8), aos 30 dias de introdução *in vitro*. Com o teste de médias (Tukey a 5% de probabilidade), constatou-se que o melhor tempo de imersão foi de 4 horas, que diferiu estatisticamente do tempo de 8 horas (para as duas variáveis). Os resultados obtidos variando a concentração do produto no meio de cultura não diferiram estatisticamente para nenhuma das variáveis avaliadas. Para contaminação por bactérias, não houve diferença estatística para nenhum dos tratamentos (TABELA 11). Para necrose houve interação entre a concentração de PPM® no meio de cultura e o tempo de imersão na solução desinfestante.

No experimento seguinte, onde se testou menores tempos (1; 2; 3 e 4 h) de imersão no PPM®, também não teve diferença estatística entre os tratamentos para nenhuma das variáveis testadas (ANEXO 3), sendo a menor taxa de contaminação fúngica de 85,71% (86%) considerada como inaceitável (TABELA 10).

TABELA 11–RESULTADOS DA ANOVA DO EXPERIMENTO FATORIAL COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PPM® ADICIONADO AO MEIO DE CULTURA E DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE PPMPARA INTRODUÇÃO *INVITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE *A. mearnsii*. AOS 27 DIAS DE INTRODUÇÃO *IN VITRO*.

Tempo (h)	Fungos (%)	C.V. (%)	Bactérias (%)	C.V. (%)	Necrose (%)	C.V. (%)
4	16,25 a	22,5	53,75 a	9,3	29,38	16,5
6	23,13 ab	15,8	48,75 a	10,2	29,38	16,5
8	35,63b	10,2	42,50 a	11,7	33,13	15,6
^{**1} sig.	0,02*		0,291		^{**2} 0,045	

NOTAS: ^{**1}Sig. ANOVA (p<0,05). Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ^{**2} Para variável necrose, a ANOVA deu significativamente diferentes para interação entre concentração de PPM® no meio e tempo de imersão no produto.

FONTE: o autor, 2013.

Em tratamentos para introdução *in vitro* de *A. mearnsii*, o PPM® não foi eficaz para se obter culturas livres de microrganismos e sadias. Dutra *et al.* (2008), em desinfestação de segmentos nodais oriundos de minicepas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) testou o mesmo produto que foi também adicionado ao meio de cultura, e conclui que o tratamento foi eficaz para o controle da contaminação, mas proporcionou altas taxas de oxidação (100%) mostrando um

efeito fitotóxico para a cultura. Para desinfestação foliar de breu branco (*Protium heptaphyllum*), o PPM® a 1 e 2 % não foi eficaz para o controle de microrganismos pois a taxa de contaminação foi em torno de 85% (LIMA, 2012).

3.3.3 Efeito do uso de HCl sozinho ou combinado com HgCl_2 ou NaOCl para desinfestação de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*

O ensaio utilizando HCl como solução desinfestante não foi eficiente pois houve alta incidência de bactérias e necrose em todos os tratamentos testados (TABELA 12). Não houve diferença estatística para os tempos de imersão no ácido clorídrico. Após 15 dias de introdução *in vitro* não havia sobreviventes.

TABELA 12 – RESULTADOS DO EXPERIMENTO TESTANDO ÁCIDO CLORÍDRICO EM DIFERENTES TEMPOS PARA INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE *A. mearnsii* APÓS 15 DIAS DE CULTIVO.

² T (min.)	PPM (meio)	Fungo (%)	Bactéria (%)	Necrose (%)
5	1 ml.L ⁻¹	25	69	46
10		20	74	56
15		23	79	64
20		26	76	57
³ Sig.		0,96	0,81	0,39
Média		23,50	74,50	55,75
⁴ C.V.(%)		32,00	9,90	13,34

NOTAS: Tratamento com álcool etílico 70% por 10 segundos e ácido clorídrico. ²T = tempo de imersão no ácido clorídrico (pH 3,5). ³Sig. ANOVA (p<0,05). ⁴ Coeficiente de variação (C.V.).

FONTE: o autor, 2013.

O ensaio testando diferentes produtos (cloreto de mercúrio sozinho ou combinado com HCl ou com hipoclorito de sódio) demonstrou que os tratamentos não foram eficientes no controle da contaminação e da necrose (TABELA 13). Analisando o experimento com dados de contaminação por fungos, coletados aos 7 dias, observa-se que não houve diferença estatística (ANOVA) entre os tratamentos (ANEXO 4). Para contaminação por bactérias, houve interação entre os tempos de imersão no cloreto de mercúrio (HgCl_2) e no

hipoclorito de sódio (por 10 minutos), sendo o tratamento com HgCl_2 por 10 minutos seguido de hipoclorito de sódio o melhor tratamento, com 40% de contaminação por bactérias (TABELA 13), comprovado pelo teste de Bonferroni ($p=0,003$), ou seja, a diferença foi altamente significativa. Avaliando a porcentagem de explantes necrosados, o tempo de 10 minutos apresentou melhores resultados (média de 46%) do que 15 minutos, onde a taxa foi muito alta (66%), com diferenças significativas. Com 15 dias, não havia explantes livres de contaminações e/ou necrose.

TABELA 13 – RESULTADOS DO EXPERIMENTO TESTANDO DOIS TEMPOS DE IMERSÃO NO HgCl_2 E ADIÇÃO DE PRODUTOS (NaOCl E HCl) NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *A. mearnsii* APÓS 7 DIAS DE INTRODUÇÃO *IN VITRO*.

	T^{*1} (min)	NaOCl (%)	T^{*1} (min)	HCl	T^{*1} (min)	Fungos (%)	Bactéria (%)	Necrose (%)
	10					20	73	43
	15					23	70	68
HgCl_2 0,3%	10	2	10			33	40	35
	15					25	60	63
	10			pH 3,5	2	23	80	60
	15					33	60	65

NOTAS: Tratamento com álcool etílico 70% por 10 segundos, cloreto de mercúrio 0,3% (p/v) por diferentes tempos de imersão. $*1T$ = tempo de imersão.

FONTE: o autor, 2013.

É importante destacar que, no presente estudo, muitos contaminantes apareceram após algumas semanas de cultivo, o que indica a possível presença de microrganismos endofíticos. O mesmo sucedeu na desinfestação de *Eugenia involucrata* (GOLLE *et al.*, 2013). No caso dessa espécie, além do uso do hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) durante 15 minutos, foi realizada uma etapa prévia com bicloreto de mercúrio (HgCl_2) a 0,05% (p/v) por 10 minutos. Porém, com o decorrer do experimento, o aumento nas contaminações de origem endógena inviabilizou os cultivos, permitindo inferir que ramos lenhosos não constituem a fonte de explantes mais adequada para o cultivo (GOLLE *et al.*, 2013).

Contudo, existem relatos de sucesso na desinfestação de lenhosa, inclusive do gênero *Acacia*. Por exemplo, para desinfestar explantes nodais de *Acacia auriculiformis* com 18 meses de idade, utilizou-se imersão em álcool etílico 70% por um minuto seguido de 15 minutos no hipoclorito de sódio a

1% adicionando gotas de Twenn 20®, e uma média de 75% de sobrevivência foi atingida (GIRIJASHANKAR, 2011).

No caso da lenhosa *Ulmus minor* Mill., o cultivo de brotações diretamente extraídas das plantas no campo resultou em contaminações muito elevadas, próximas a 100%. Contudo, com o emprego de ramos com brotos dormentes, mantidos em casa de vegetação, as contaminações reduziram-se em 90% (CONDE *et al.*, 2008). Para introdução *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus benthamii* x *dunnii*, Brondani *et al.* (2009) recomendam imersão em solução de álcool 70% (v/v) por 15 segundos e 0,5% de cloro ativo por 10 minutos para desinfestação dos explantes. Os segmentos nodais utilizados nos experimentos de desinfestação foram coletados de cepas, mantidas em casa de vegetação com tratamentos de fertirrigação para melhorar as condições fisiológicas da planta matriz e utilizou concentrações e produtos semelhantes aos relatados para espécies lenhosas, porém as taxas de contaminação e necrose inviabilizaram o estabelecimento *in vitro* da acácia negra. As espécies arbóreas apresentam dificuldade para o estabelecimento *in vitro* devido à grande diversidade de microrganismos contaminantes, principalmente se for utilizado material vegetal de indivíduos adultos (COUTO *et al.*, 2004).

Relatos de sucesso para introdução *in vitro* de espécies lenhosa se dão com o uso de fungicida Benomyl® (proibido o uso no Brasil). Alguns protocolos de desinfestação fazem uso de antibióticos em tratamento prévio, na planta matriz, junto com fungicida. Em *Eugenia involucrata*, Gollee *et al.* (2013) fizeram uso do fungicida Cercobin 1g.L⁻¹ e sulfato de estreptomicina a 0,1 g. L⁻¹, visando a uma pré-desinfestação nas plantas matrizes e o resultado foi de 92% de sobrevivência dos explantes introduzidos *in vitro*. Neste estudo de desinfestação de acácia para introdução *in vitro* foram feitas a pré desinfestação utilizando Cercobin a 2 g. L⁻¹ pelo menos uma vez por semana e 24 horas antes da coleta dos explantes.

O sucesso da técnica de micropropagação tem como seu ponto de partida a recomendação de um protocolo de assepsia e estabelecimento *in vitro* com o maior número de explantes assépticos, menor produção de compostos fenólicos (oxidação) e com maior sobrevivência dos explantes para as etapas seguintes. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica da micropropagação. Os diferentes

métodos empregados para o estabelecimento *in vitro* em diferentes estudos demonstram a influência dos diferentes biomas brasileiros no que se refere à composição microbiológica associada às plantas, bem como, às particularidades morfológicas das sementes (rugosidade) e gemas (tricomas), abrigando os microrganismos (FERMINO Jr. *et al.*, 2009).

Os melhores resultados de desinfestação se deram com o uso de álcool etílico por 10 segundos, seguidos de HgCl_2 a 0,4% por 15 minutos, NaOCl 3% por 10 minutos, sendo que a taxa média de contaminação por fungos e/ou bactérias ficou em torno de 9%. Mesmo que a taxa de contaminação tenha sido menor, a taxa de necrose foi aumentando gradativamente e, aos 60 dias, havia poucos sobreviventes. Logo, a manutenção dos explantes por tempo superior a 60 dias, visando à multiplicação, foi, até o momento, inviável. Neste sentido, a continuidade dos trabalhos com micropropagação se faz necessária, visto que esta técnica teria grande impacto na produção de mudas desta espécie, principalmente de material adulto, o qual é difícil de ser propagado vegetativamente.

3.4 CONCLUSÕES

A desinfestação dos segmentos nodais utilizando como soluções desinfestantes, álcool etílico e hipoclorito de sódio não é eficaz para controle de fungos e bactérias.

A adição de solução de cloreto de mercúrio (HgCl_2) no tratamento de desinfestação diminui a incidência de fungos e bactérias mas aumenta a taxa de necrose dos explantes.

A utilização do produto PPM® no meio de cultura e como solução desinfestante, em concentrações recomendadas pelo fabricante para espécies lenhosas, não proporciona resultados satisfatórios para introdução de segmentos nodais de *A. mearnsii*.

O uso de ácido clorídrico (pH 3,5),diminui a taxa de contaminação por fungos mas por bactérias foi alta (70%) e, após duas semanas, não havia explantes sadios.

Os tratamentos testados não apresentaram resultados conclusivos para introdução *in vitro* de *Acacia mearnsii*, pois os melhores tratamentos para desinfestação, apesar de diminuir a presença de fungos e bactérias, aumenta a necrose. Os explantes livres de contaminações, que não apresentam necrose, desenvolvem folhas, mas não formam novas brotações.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). **Anuário estatístico da ABRAF 2013**: ano base 2012. Brasília: ABRAF, 2013. 149 p.

BARRUETO CID, L. P.; JORDAN ZIMMERMAN, M. **A contaminação *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 20 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 122).

BIANCHI, V. J.; CHAVES, A. da C.; SCHUCH, M. W.; FACHINELLO, J. C. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 177-179, 2003.

BOLLE-JONES, E. W. Nutrition of *Hevea Brasiliensis*. II. Effect of nutrient deficiencies on growth, chlorophyll, rubber and mineral contents of Tjirandji seedlings. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaya**, v. 14, p. 209-230, 1954.

BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNING, J.; Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, vol.33, n.1, jan./fev. 2009.

BRONDANI, G. E.; HANSEL, F.A.; DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; Desinfestação e meio de cultura para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Liquidambar styraciflua*. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 40, n. 3, p. 541-554, jul./set. 2010.

CONDE, P.; SOUSA, A.; COSTA, A.; SANTOS, C. A protocol for *Ulmus minor* Mill. micropropagation and acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 113-119, Jan. 2008.

CORREIA, D.; GRAÇA, M. E. C. In vitro propagation of Black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild.). **IPEF**, Piracicaba, n. 48/49, p. 117-125, jun./dez. 1995.

COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E.P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.5, p.633-642, set./out. 2004.

DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture**: essential methods. Chichester, UK: Willey-Blackwell, 2010. 359 p.

DOMINI, L.P.; FERREIRA-MOURA, I.; GUISSO, A.P.; SOUZA, J.A. de.; VIÉGAS, J. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 517-522, 2005.

DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A.; WENDLING, I. **Introdução ao cultivo *in vitro* de Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 38).

FERMINO Jr., P. C. P.; NAGAO, E. O.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, dez. 2009.

FLORES, R.; MALDANER, JOSEILA; NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n.3, maio/jun. 2006.

GIRIJASHANKAR, V. Micropropagation of multipurpose medicinal tree *Acacia auriculiformis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, Hyderabad, India, v. 5, n. 3, p. 462-466, 4 Feb. 2011.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; BELLÉ, R. A.; CURTI, A. R. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Revista CERNE**, Lavras, vol. 19, p. 77-82, 2013. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=74425783010>> Acesso em: 02 out. 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M, A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v. 1. Brasília: Embrapa/CNPq, 1998. p. 183-260.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, JÚNIOR. F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: principles and practices**. 7th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

HIRATA, M. H.; MANCINI FILHO, J. **Manual de biossegurança**. Barueri: Ed. Manole, 2002. 496p.

LIMA, S. de S.; **Propagação vegetativa do *Protium* spp: *Protium heptaphyllum*, *Protium spruceanum* e *Protium guacayanum***. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2012.

LING, W.; YAN, X. Research on tissue culture and propagation of *Populus deltoids* cl."725". **Journal of Anhui Agricultural University**, Suzhou, China, vol. 40, p. 612-617, 2013. Disponível em: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/20133312068.html?resultNumber=0&q=cc%3A%22FF170%22>>. Acesso em: 16 set. 2013.

MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação *in vitro*. **ABTCP Notícias**, n. 36, p. 5-10, 2000.

MORAES, A. M. DE; ALMEIDA, F.C.; CAZÉ FILHO, J. Desinfestação e estabelecimento in vitro de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia & Ciências Agropecuária**, João Pessoa, v.1, n.2, p.39-44, dez. 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

PIZA, I.M. de T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Reguladores vegetais na micropropagação do abacaxizeiro. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 280, p. 681-690, 2001.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSKI, L.; GUERRA, M.P. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 115-122, 2003.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. 152 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotechnology florestal**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 55-74.

XAVIER, A.; OTONI, W. C. Aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense** (on-line), vol. 33, n. 2, p. 303-307, 2009. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43613279013>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; AMUTHA, S.; SELVARAJ, N. In vitro propagation of *Acacia* species a review. **Plant Science**, v. 163, p. 663-671, 2002.

4 CAPÍTULO 2 - MICROPROPAGAÇÃO DE *Acacia mearnsii* De Wild. A PARTIR DE PLÂNTULAS CRESCIDAS *IN VITRO*

RESUMO

Acacia mearnsii De Wild apresenta grande potencial econômico, principalmente no estado do Rio Grande do Sul. A madeira é utilizada como matéria-prima na indústria de papel, celulose, compensada e carvão. Da casca é retirado tanino utilizado em diversos setores industriais. Para o melhoramento genético da espécie, cruzamentos controlados são realizados para obtenção de sementes superiores, porém a taxa de sucesso desta polinização é baixo. A micropropagação pode ser utilizada para produção/multiplicação massal de plântulas provenientes destas sementes. Este estudo teve com objetivo melhorar a taxa de produção/multiplicação de plântulas originadas de sementes obtidas de polinização controlada de acácia-negra através da micropropagação. Vários experimentos foram realizados para encontrar o melhor regulador vegetal e a concentração adequada para indução de gemas axilares em explantes obtidos a partir de segmentos nodais de plântulas de *A. mearnsii* crescidas *in vitro* e foram testadas duas classes de tamanho das mudas na aclimatização/rustificação. BAP (2,2; 4,4 e 8,8 μM), TDZ (0,2; 0,4; 0,8 μM), cinetina (2,2; 4,4 e 8,8 μM), GA₃ (2,2; 4,4 e 8,8 μM) e combinações de BAP com giberelina (2,2 μM de GA₃ e 2,2; 11 e 22 μM de BAP) foram adicionados ao meio de cultura MScom $\frac{3}{4}$ dos sais, vitaminas e compostos orgânicos completos, 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar. As variáveis analisadas foram submetidas a teste de homogeneidade das variâncias (Levene), análise de variâncias (ANOVA) e teste de médias (Tukey ou Bonferroni $p < 0,05$), utilizando o programa IBM SPSS Statistic 19®. Dentre os tratamentos testados com citocinina, o que apresenta as melhores taxas de multiplicação (5,89 e 5,28 gemas/segmento nodal aos 30 dias) é o tratamento com 8,8 e 4,4 μM de BAP. O subcultivo com adição de 2 g.L⁻¹ de carvão ativado no meio de cultura promoveu multiplicação (média de 7,95 gemas/ segmento nodal), alongamento das brotações e enraizamento, sendo portanto recomendado. A taxa de sobrevivência das mudas aclimatizadas foi maior que 90%, aos 150 dias no viveiro, independente da classe de tamanho testada.

Palavras-chave: Acácia negra. Aclimatização. Multiplicação *in vitro*.

ABSTRACT

MICROPROPAGATION OF *Acacia mearnsii* De Wild. OF SEEDLINGS GROWN *IN VITRO*

Acacia mearnsii De Wild. is a species economically important in the state of Rio Grande do Sul. Tannin extracted from its bark is used in various industrial sectors and, its wood is used as raw material in the pulp, paper and wood panels industries, firewood and charcoal. A breeding program involving controlled crosses is being developed in order to obtain superior seeds. However, the number of seeds obtained from the controlled pollination is low. This study aimed to improve the rate of production / multiplication of seedlings originated from seeds obtained from controlled pollination of black wattle by micropropagation. Several experiments were carried out to find the best growth regulator and appropriate concentration for induction of axillary buds in explants obtained from nodal segments of *Acacia mearnsii* seedlings grown *in vitro*. BAP (2.2 , 4.4 and 8.8 μM), TDZ (0.2, 0.4, 0.8 μM), kinetin (2.2, 4.4 and 8.8 μM), combinations of BAP with gibberellin (2.2 GA_3 μM and 2.2 ; 11 ; 22 μM BAP), gibberellin (2.2 , 4.4 and 8.8 μM) were added to MS medium with $\frac{3}{4}$ of the salts concentration, full strength vitamins and organic compounds, 30 g.L^{-1} sucrose, solidified with agar. The variables analyzed were submitted to the homogeneity test of variances (Levene), analysis of variance (ANOVA) and mean test (Tukey or Bonferroni $p < 0.05$), using IBM SPSS Statistic 19® program. The best multiplication rates (5.89 buds/explant at 30 days) resulted from the treatments with 8.8 μM BAP. Activated charcoal promoted shoot and root growth. More than 90% of the seedlings survived after acclimatization of micropropagated plants by direct transfer to the green house, regardless of cutting size (2-8 cm). No statistical differences were detected in survival rate and seedlings height at 150 days.

Keywords: acclimatization, black wattle, multiplication.

4.1 INTRODUÇÃO

Acacia mearnsii De Wild., popularmente conhecida como acácia negra, pertencente a família Fabaceae é natural do sudeste da Austrália. Apresenta grande potencial econômico, principalmente no estado do Rio Grande do Sul. É uma espécie promissora em sistemas agroflorestais, cuja madeira está sendo utilizada como matéria-prima na indústria de papel, celulose, compensada (ROVERSI *et al.*, 2002) e carvão. Da casca é retirado tanino utilizado em diversos setores industriais (ABRAF, 2013).

Para o melhoramento genético da espécie, cruzamentos controlados são realizados para obtenção de sementes de indivíduos/ famílias superiores. O percentual de inflorescência que formam vagem nestes cruzamentos de polinização controlada é baixo, em média 12% (PAULA, 2005), o que representa um problema, pois essa técnica envolve custos com equipe treinada, equipamentos e tempo. A micropropagação pode ser utilizada para produção/multiplicação massal de plântulas provenientes destas sementes, pois é uma técnica que exige pequeno espaço físico, produz mudas livres de doenças e a taxa de multiplicação é superior a da estaquia convencional (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). As espécies lenhosas apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente se for utilizado material vegetal proveniente de plantas adultas, pois podem apresentar infestação interna ou externa por microrganismos (COUTO *et al.*, 2004). Por isso, a utilização de plântulas germinadas *in vitro*, em condições assépticas, torna-se mais vantajosa (SKIRVIN, 1981).

A indução e expressão das possíveis respostas morfogênicas em culturas de células, tecidos e órgãos *in vitro*, são dependentes de fatores externos, químicos e físicos, como meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais (GEORGE *et al.*, 2008), e também de fatores inerentes ao material vegetal, como fatores hereditários, estado fisiológico do explante e da planta que lhe deu origem (CALDAS *et al.*, 1998). Dos fatores externos, pode-se destacar a utilização dos reguladores de crescimento como as citocininas e auxinas (KERBAUY, 2004; GEORGE *et al.*, 2008).

Segundo Grattapaglia e Machado (1998) as citocininas constituem o grupo de fitorreguladores indispensável para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares; o tipo e a concentração das mesmas são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. Entre as citocininas naturais encontram-se a zeatina (ZEA) e 2-isopenteniladenina (2iP) enquanto que as sintéticas destacam-se a cinetina (CIN), 6-benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ). Taiz e Zeiger (2009) complementam que as citocininas promovem divisão, alongamento e diferenciação celular e retardam a senescência das plantas. De forma geral, as citocininas promovem produção de partes aéreas, mas seu excesso pode ser tóxico e levar ao encurtamento dos entrenós e a problemas na fase de enraizamento (SILVA *et al.*, 2003 citando LANE, 1979 e LESHEM *et al.*, 1988). Outros efeitos residuais atribuídos a citocininas têm sido observados nas plantas após o transplântio (SILVA *et al.*, 2003). Menor capacidade de sobrevivência, quebra da dominância apical, deformação de frutos e manutenção de um hábito arbustivo são algumas dessas características (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998).

Várias citocininas têm sido descritas para regeneração e indução de múltiplas brotações para espécies de *Acacia*. A mais utilizada na etapa de multiplicação *in vitro* é BAP, individualmente ou combinada com outras como a zeatina, cinetina (VENGADESAN *et al.*, 2002). O BAP tem sido muito utilizado por diversos autores para promover a multiplicação da parte aérea e surgimento de gemas adventícias, em diversas espécies. Isso fez com que o BAP fosse considerado um regulador vegetal de excelência a ser utilizado em trabalhos de micropropagação (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998).

As auxinas, outro grupo de reguladores de crescimento fundamentais na indução da divisão celular e diferenciação de raízes, muitas vezes utilizadas nas fases de multiplicação para favorecer o crescimento das culturas (MANTOVANI *et al.*, 2001).

As giberelinas afetam vários aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal, mas são mais conhecidas pelo efeito no alongamento dos entrenós de algumas plantas (TAIZ e ZEIGER, 2009). O ácido giberélico (GA₃) é a giberelina mais utilizada na micropropagação, com efeitos similares aos das auxinas, mas em alguns gêneros podem ser mais eficaz. A adição de GA₃ no meio de cultura pode auxiliar no crescimento e desenvolvimento da parte

aérea, diminuir ou impedir a formação de raízes adventícias, brotos ou embriões somáticos. Na fase de alongamento, tratamento com GA₃ pode ser benéfico quando, na multiplicação utilizou citocinina e obteve brotações muito pequenas (GEORGE *et al.*, 2008).

A micropropagação de acácia negra tem sua problemática na definição do meio básico a ser utilizado e do balanço adequado entre auxinas e citocininas, principalmente na etapa de multiplicação de gemas (DISARZ e CORDER, 2009).

A aclimatização é a fase da micropropagação em que ocorre a transferência das mudas produzidas *in vitro* para o ambiente externo, a casa de vegetação e, posteriormente, para o campo (PEREIRA *et al.*, 2005). Um dos obstáculos para a aplicação prática dos métodos de cultura de tecidos é a dificuldade de transferir com sucesso as mudas das condições *in vitro* para *ex vitro* em razão da diferença entre as duas condições (SILVA *et al.*, 2003). Fatores como genótipo, estresse hídrico, alteração do metabolismo heterotrófico (*in vitro*) para autotrófico, infecção por patógenos e estresse pela luz, além das variações de temperatura, interferem no sucesso da aclimatização. Esse processo representa uma etapa importante dentro de um programa onde se trabalha com cultura de tecidos, sendo que, em alguns casos, chega a ser o fator limitante no processo de micropropagação (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1990).

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos de reguladores vegetais na formação de gemas para multiplicação de mudas germinadas *in vitro*, alongamento e aclimatização *ex vitro* das plantas micropropagadas.

Os objetivos específicos foram: testar o efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina, thidiazuron (TDZ), ácido giberélico (GA₃) e combinações de BAP com GA₃ para multiplicação e alongamento de segmentos nodais de *Acacia mearnsii* e testar a influência do tamanho das mudas micropropagadas na aclimatização/rustificação *ex vitro*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal da Universidade Federal do Paraná.

Plântulas germinadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes para instalação dos testes de micropropagação. As sementes utilizadas foram procedentes de área de produção de sementes da empresa TANAGRO S.A. A quebra de dormência das sementes foi feita com água fervente por um minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 2% (v/v), por 10 minutos agitando, e finalmente três enxagues em água destilada e esterilizada, onde permaneceram por aproximadamente uma hora, até a inoculação.

4.2.2 Multiplicação, alongamento e enraizamento

4.2.2.1 Condições e meios de cultura

Os explantes foram segmentos nodais obtidos de plântulas de 40 dias, com $1 \pm 0,3$ cm de tamanho, contendo apenas uma gema axilar.

Os explantes foram introduzidos em tubos de ensaio de vidro, de 2 cm de diâmetro por 15 cm de altura, com tampa de polietileno, com 10 ml de meio de cultura cada. O meio nutritivo utilizado em todas as etapas foi o MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), com sais reduzidos a $\frac{3}{4}$, vitaminas completas, 30g.L^{-1} de sacarose, pH ajustado a $5,8 \pm 2$, solidificado com $7,5\text{ g.L}^{-1}$ de ágar bacteriológico (Himedia®). A autoclavagem foi realizada a 121°C e com $1,1\text{ Kg/cm}^2$ de pressão por 20 minutos. As culturas foram mantidas em temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob lâmpadas fluorescentes de 30W, tipo “luz do dia”, gerando luminosidade média de 2800 lux e fotoperíodo de 16 horas.

Antes da autoclavagem, foram adicionados ao meio de cultura, reguladores vegetais (BAP, cinetina, giberelina, TDZ) e/ou 2 g.L⁻¹ de carvão ativado (TABELA 14).

TABELA 14 - RESUMO DOS TRATAMENTOS COM REGULADORES VEGETAIS NAS ETAPAS DE MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO.

Reguladores vegetais	Concentrações (µM)		
BAP	2,2	4,4	8,8
Cinetina	2,2	4,4	8,8
TDZ	0,2	0,4	0,8
GA ₃	2,2	4,4	8,8
2 µM GA ₃ + BAP	2,2	11	22

FONTE: o autor, 2013.

Foram analisadas as seguintes variáveis: número médio de gemas, de brotos (número de gemas com caule alongado com tamanho suficiente para formar novo subcultivo), tamanho (medido com régua graduada), porcentagem de brotos enraizados e porcentagem de calo para cada tratamento. Foi observado também porcentagem de contaminação (por bactérias e/ou fungos), necrose e sobrevivência.

4.2.2.2 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado para todos os testes de multiplicação foi de blocos ao acaso (DBC) com 5 blocos e 8 plantas por parcelas (40 plantas por tratamento). O número de tratamentos (concentrações de reguladores vegetais) variou de 4 a 7. As avaliações foram feitas aos 30, 45 e 60 dias de cultura, quando se avaliou o tamanho dos explantes, número de gemas, número de brotos, presença de calo na base do caule e raízes.

Cada experimento foi submetido a um teste de homogeneidade das variâncias (Levene), análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$ e $p < 0,01$) e teste de médias, Bonferroni ou Tukey a 5% de probabilidade, usando programa IBM SPSS Statistic 19®. A variável que não constou ser homogênea foi submetida a transformação através de raiz quadrada de $(x+0,5)$, sendo x a variável medida

no experimento. No experimento que recebeu BAP e depois carvão ativado foi realizado o Teste T de Student, no programa IBM SPSS Statistic 19®.

4.2.3 Experimentos Desenvolvidos

4.2.3.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP e do carvão ativado na multiplicação e alongamento

Segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de comprimento foram inoculados em meio nutritivo suplementado com diferentes concentrações de BAP (2,2; 4,4 e 8,8 μM) e testemunha, sem BAP.

O arranjo experimental foi em delineamento em blocos casualizados (DBC) com 4 tratamentos, 5 blocos com 8 plantas por parcelas (40 plantas por tratamento).

Com 45 dias, foram transferidas para meio de cultura MS $\frac{3}{4}$ de sais, vitaminas, inositol e sacarose, suplementado com 2 mg.L^{-1} de carvão ativado, onde permaneceram por mais 45 dias. Foi analisado o efeito do carvão ativado para variável número de gemas por segmento nodal, mediante o Teste T (Student) utilizando o programa IBM SPSS Statistic 19®.

Este material vegetal multiplicado e alongado foi usado nos experimentos com cinetina, TDZ e BAP junto com GA_3 .

4.2.3.2 Efeito de diferentes concentrações de cinetina ou TDZ na multiplicação

Segmentos nodais de aproximadamente 1 cm, provenientes do subcultivo em meio MS $\frac{3}{4}$ de sais e adição de 2 g.L^{-1} de carvão ativado, foram divididos e transferidos para tubos de ensaio com 10 ml de meio de cultura MS $\frac{3}{4}$ de sais, suplementado com diferentes concentrações de cinetina (2,2; 4,4 e 8,8 μM), TDZ (0,2; 0,4 e 0,8 μM) e a testemunha que não continha nenhum regulador vegetal.

O delineamento usado foi de blocos ao acaso sendo 7 tratamentos, 5 repetições com 8 plantas por parcelas (40 segmentos por tratamento).

4.2.3.3 Efeito de diferentes combinações de BAP combinada com giberelina (GA₃) na multiplicação e alongamento

Adicionou-se no meio de cultura 2 μ M de giberelina e diferentes concentrações de BAP (2,2; 11; 22 μ M), sendo a testemunha sem nenhuma adição. Os explantes provenientes de segmentos nodais de um cm foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura e avaliados após 30 dias de subcultivo.

O arranjo experimental foi em delineamento em blocos casualizados (DBC) com 4 tratamentos, 5 blocos com 8 explantes por parcela (40 explantes por tratamento).

4.2.3.4 Efeito de diferentes concentrações de GA₃ no alongamento

Segmentos nodais provenientes da mesma germinação que os anteriores, com aproximadamente 1 cm de comprimento foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio nutritivo complementado com giberelina (GA₃) sendo as concentrações de 2,2; 4,4; 8,8 μ M. Após 30 dias, foi realizada a avaliação do comprimento, presença de raiz, calo, número de gemas e brotos.

As micromudas provenientes dos testes de multiplicação e alongamento foram subcultivadas em meio contendo 2 g.L⁻¹ de carvão ativado, por no mínimo 40 dias, antes de serem encaminhadas para aclimatização.

4.2.4 Aclimatização/rustificação *ex vitro*

4.2.4.1 Influência do Tamanho das Micromudas

Para aclimatização, mudas micropropagadas e provenientes de vários subcultivos, foram separadas em duas classes de altura: 2 a 4,9 cm e 5 a 8 cm. Para padronizar as mudas foram cortadas cerca de 80% do volume de raízes e folhas de cada indivíduo. Foram plantadas em bandejas de plástico medindo 55

cm de comprimento, 28 cm largura e 5,5 cm de altura, com substrato a base de vermiculita, onde permaneceram por 20 dias até serem transferidas para tubetes de 280 cm³, com substrato a base de casca de pinus marca comercial Plantmax®. As mudas permaneceram em casa de enraizamento, com cobertura de plástico transparente, luz natural e temperatura de $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade constante de $92\% \pm 3\%$ por mais três semanas, totalizando 40 dias (ou 6 semanas). Foram transferidas para casa de sombra, com sombrite de 50%, temperatura ambiente (dezembro/ 2013, temperatura média de 22°C) e irrigação por 10 minutos duas vezes ao dia, por uma semana. Após este período, foram levadas para área de rustificação do viveiro, onde recebeu irrigação duas vezes ao dia por 15 minutos e sol pleno. Todas as mudas foram fertirrigadas duas vezes por semana, a partir do segundo dia da instalação do experimento. As avaliações de sobrevivência foram realizadas mensalmente e as alturas foram medidas aos 90, 120 e 150 dias da instalação.

O experimento foi organizado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com dois tratamentos (duas classes de altura), 8 repetições e 5 plantas por parcelas, totalizando 40 plantas por tratamento.

O experimento foi submetido a teste de homogeneidade das variâncias (Levene), análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) usando programa IBM SPSS Statistic19®.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Material vegetal

As sementes apresentaram alta taxa de germinação (em média 90%), com plântulas de aspecto normal. A taxa de contaminação por fungos ou bactéria foi baixa (2%), não representando empecilho para o uso destas plântulas no presente estudo.

4.3.2 Efeito de diferentes concentrações de BAP e do carvão ativado na multiplicação e alongamento

No experimento onde diferentes concentrações de BAP foram testadas, houve homogeneidade das variâncias para as variáveis mensuradas. Como constou diferença estatística significativa ($p < 0,01$) na ANOVA para número de gemas, realizou-se teste de Tukey ($p < 0,05$). As concentrações de 4,4 e 8,8 μM de BAP, diferiram estatisticamente dos outros tratamentos para número de gemas formadas por segmento nodal, após 30 dias (TABELA 15). Resultados semelhantes foram encontrados por Borges Jr. *et al.* (2004), que relatam que a maior taxa de multiplicação de gemas (3,1 gemas/explante) para *Acacia mearnsii* foi obtida com 2 mg.L^{-1} (8,8 μM) de BAP em meio de cultura B5. Correia e Graça (1995) obtiveram maior proliferação de brotos de *Acacia mearnsii* (3,5 brotos/explante) com a suplementação de 13,32 μM de BAP e 0,25 μM de AIB em meio MS. O BAP tem sido muito eficaz na multiplicação de diversas espécies (BORGES *et al.*, 2004).

A análise estatística (ANOVA) das outras variáveis (número de brotos, porcentagem de calos e de enraizamento) indicou diferença entre a testemunha (sem BAP) e os tratamentos BAP (TABELA 15), o que comprovou a existência de resposta diferenciada dos explantes com a adição do BAP.

Para número de brotos por segmento nodal, o melhor tratamento foi a testemunha (sem BAP), pois apesar de grande quantidade de gemas formadas no tratamento com BAP, estas estavam aglomeradas, dificultando a divisão em novas plantas. Resultados semelhantes foram obtidos por Mantovani *et al.* (1999) na micropropagação de *Didymopanax morototoni*, que relataram que a alta concentração de BAP (de 1 mg.L^{-1} a 10,0 mg.L^{-1} ou de 4,44 a 44,38 μM) em meio WPM, provocou a formação de brotações atípicas, com entrenós curtos e folhas curvadas, espessas, quebradiças e de tamanho reduzido. Estes sintomas são provocados por desordens fisiológicas que ocorrem frequentemente na cultura *in vitro* de muitas espécies, e são atribuídas principalmente ao excesso de citocininas nos meios de cultura (ZIV, 1991).

Verificou-se que todas as concentrações de BAP utilizadas promoveram o desenvolvimento de calo na base do explante (TABELA 15), o que não é

desejável. A testemunha foi a que apresentou menor taxa de calogênese. Os calos tinham maiores dimensões principalmente nos tratamentos com concentrações elevadas de BAP. Isso mostra que o explante, mesmo estando em condições *in vitro* e subcultivado com apenas uma gema axilar, produz fitohormônios, o que justifica a boa formação de gemas (4,33 / explante) mesmo sem adição de reguladores vegetais no meio (TABELA 15). Borges *et al.* (2004) também constataram a formação de calos na base de explantes de *A. mearnsii* que não foram submetidos a ação de reguladores vegetais. A formação de calos na base do segmento nodal pode comprometer a proliferação de gemas axilares e afetar o enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A maior taxa de enraizamento foi da testemunha, com 80% dos explantes enraizados (TABELA 15). Esse resultado mostra que a planta tem auxina endógena que pode favorecer o enraizamento. Nos demais tratamentos, a taxa de enraizamento vai diminuindo em função do balanço auxina / citocinina que está sendo alterada pela BAP adicionada no meio de cultura.

TABELA 15 – EFEITO DO BAP NA FORMAÇÃO DE BROTO, CALOS NA BASE DO EXPLANTE E RAÍZES APÓS 30 DIAS DE CULTURA DE SEGMENTOS NODAIS DE *Acacia mearnsii* EM MEIO DE CULTURA MS COM ¾ DE SAIS.

Tratamentos	Nº gemas/ seg. nodal	Nº brotos / seg. nodal	Calos(%)	Enraizamento (%)
0	4,33b	2,73 a	5,00b	80,0 a
2,2 µM BAP	4,14b	1,40b	90,0a	5,00b
4,4 µM BAP	5,28 ab	1,40b	90,0a	7,50b
8,8 µM BAP	5,89 a	1,34b	92,5a	0,00b
Sig.	0,005**	0,00**	0,00**	0,00**
Média	4,91	1,71	69,37	23,12
C.V. (%)	8,89	10,22	10,29	35,99

NOTA:**Sig. ANOVA (p<0,01). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média = Média geral dos tratamentos. C.V.= Coeficiente de Variação.

FONTE: o autor, 2013.

Para número de brotos por segmento nodal, calos e enraizamento, os melhores resultados foram obtidos sem a presença de BAP, comprovado estatisticamente, ou seja, os resultados indicam que o BAP influenciou negativamente estas três variáveis mensuradas (TABELA 15). Mas, vários autores testando reguladores vegetais com o gênero *Acacia*, recomendam o uso

de BAP na etapa de multiplicação. Para a multiplicação de segmentos nodais de *A. nilotica* subespécie *indica*, recomendam o uso de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ($6,6 \text{ }\mu\text{M}$) de BAP em meio B5, como melhor tratamento, obtendo-se 6,3 brotações/segmento nodal (DEWAN *et al.*, 1992). Para *Acacia catechu* cultivada em meio de cultura MS suplementado com $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ($6,6 \text{ }\mu\text{M}$) de BAP e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ($6,97 \text{ }\mu\text{M}$) de cinetina obtiveram 12 brotações/explante (KAUR e KANT, 2000). Girijashankar (2011) obteve maior porcentagem de brotações para segmentos nodais coletados de árvores adultas de *Acacia auriculiformis* em meio de cultura MS adicionado de 2 mg.L^{-1} ($8,8 \text{ }\mu\text{M}$) de BAP e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Porém Quoirin *et al.* (2001) relataram que a adição de $8,87 \text{ }\mu\text{M}$ de BA e/ou $1,44$ ou $2,88 \text{ }\mu\text{M}$ de GA_3 não influenciou significativamente a multiplicação de segmentos nodais de *Acacia mearnsii* em meio MS $\frac{3}{4}$.

Após 45 dias, os explantes foram repicados para meio com carvão ativado para as brotações alongarem. Todas as variáveis foram novamente avaliadas. Não teve diferença significativa entre os tratamentos (TABELA 16), mostrando que o carvão ativado pode ter adsorvido o BAP, pois a tendência de aumento do número de gemas não se manteve com a maior concentração de BAP (TABELA 16). Observou que uma a duas gemas se alongavam e produziam novas gemas, as outras permaneciam aglomeradas e, com o passar dos dias, começaram a apresentar clorose evoluindo até cor marrom avermelhada (aspecto de “seca”). Comparando os explantes antes (tratamento com diferentes concentrações de BAP) e depois de colocar em meio com carvão ativado (mesmos explantes subcultivados em novo meio), através do teste T, deu significativo ($p=0,01$) para variável número de gemas, ou seja, o carvão ativado influencia positivamente na formação de gemas.

TABELA 16 – EFEITO RESIDUAL DO BAP NO SUBCULTIVO DE SEGMENTOS NODAIS DE *A. mearnsii*, EM MEIO DE CULTURA MS ¾ COM ADIÇÃO DE 2 g. L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO, AOS 45 DIAS.

Tratamento anterior (µM)	Nº gemas/ seg. nodal	Nº brotos/ seg. nodal	Calos(%)	Enraizamento (%)
0	8,06	3,53	3,13	84,37
2,2 BAP	7,12	2,53	6,25	65,62
4,4 BAP	8,81	2,78	37,5	65,62
8,8 BAP	7,81	2,22	40,63	59,37
Sig.	0,587	0,059	0,108	0,516
Média	7,95	27,65	21,87	68,75
C.V. (%)	10,64	10,67	36,89	17,41

NOTA: *Sig. ANOVA (p<0,05). Média = média geral do tratamento. C.V.(%)= Coeficiente de Variação.
FONTE: o autor, 2013.

Quando o carvão ativado foi adicionado ao meio, apesar de não haver diferença estatística significativa entre os tratamentos (TABELA 16), os explantes provenientes do tratamento com 4,4 µM de BAP produziram um maior número de gemas (8,81/segmento nodal). Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos com o uso de carvão ativado para alongamento das brotações. Quoirin *et al.* (2001), relatam que adição de 2 g.L⁻¹ de carvão ativado no meio de cultura MS ¾ promoveu alongamento das brotações e diminuiu a clorose das folhas na fase de multiplicação de *A. mearnsii*. MANTOVANI *et al.* (1999) observaram que a multiplicação, o crescimento e a qualidade das brotações nos tratamentos contendo reguladores de crescimento foram inferiores àqueles observados no tratamento contendo apenas carvão ativado adicionado ao meio WPM, na micropropagação de *Didymopanax morototoni* (caixeta).

Pode-se observar também, que na presença do carvão ativado o número de gemas, número de brotos e percentagem de enraizamento foram maiores em relação ao tratamento com BAP e a percentagem de calo nos explantes diminuiu o que é desejável. Portanto, a presença de carvão ativado no meio MS ¾ de sais influenciou positivamente na micropropagação de *A. mearnsii*.

4.3.3 Efeito de diferentes concentrações de cinetina ou TDZ na multiplicação

Após 30 dias de cultivo, o desenvolvimento de gemas axilares, calo e raízes foi influenciado pela presença das citocininas (TABELA 17). Pelos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (K-S) e Shapiro-Wilk (S-W), a maioria dos tratamentos apresentou dados normais. Pelo teste de homogeneidade das variâncias (Levene) baseado na mediana, para todas as variáveis, a significância foi maior que 0,05, ou seja, houve homogeneidade das variâncias.

A ANOVA mostrou diferença significativa entre os tratamentos, para as variáveis: número de gemas, porcentagem de calos, enraizamento. Os dados foram então submetidos ao teste de Tukey, a 5 % de probabilidade de erro. Para a variável número de gemas por segmento nodal, o tratamento com 0,4 μM de TDZ foi superior aos tratamentos com cinetina (TABELA 17), mas não diferiu estatisticamente das medidas obtidas com as concentrações 0,2 e 0,8 μM de TDZ. A testemunha não diferiu estatisticamente dos tratamentos com cinetina, mas houve diferença entre os tratamentos com TDZ para quantidade de gemas formadas por segmento nodal (TABELA 17).

Quoirin *et al.* (1998) aplicaram reguladores vegetais com o intuito de induzir a regeneração de brotos adventícios em tecidos jovens de *Acacia mearnsii* e cotilédones cultivados na presença de 2,33 a 9,30 μM de cinetina ou 1,82 μM de TDZ e 2,69 μM de ácido naftalenoacético (ANA), em meio MS diluído pela metade, proporcionou as melhores taxas de regeneração de gemas. Neste presente estudo, o TDZ, quando comparado com a cinetina proporcionou uma maior taxa de multiplicação, ou seja, maior número de gemas formadas por segmento nodal (TABELA 17). Segundo Silva *et al.* (2008), as variações obtidas na resposta morfogênica, associadas à utilização ou não de reguladores vegetais, devem estar relacionadas, entre outros fatores, à concentração endógena de auxinas e citocininas no tecido vegetal.

Para segmentos nodais de *Annona glabra*, cultivados em meio WPM, na presença 1 mg. L⁻¹ de BAP, TDZ, cinetina ou zeatina (ZEA), o melhor tratamento foi a utilização de 1 mg. L⁻¹ (4,65 μM) de cinetina e (4,4 μM) de BAP que induziram maior crescimento durante o cultivo *in vitro* dessa espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Para multiplicação de gemas axilares induzidas em segmentos nodais de louro-pardo (*Cordia trichotoma*) cultivados em meio basal WPM, Mantovani *et al.* (2001), constataram que, inicialmente, o TDZ proporcionou uma grande proliferação de gemas, porém ao longo da cultura

essas brotações se apresentaram malformadas, com caules curtos e retorcidos e folhas atípicas. Na propagação *in vitro* de *Bauhinia cheilantha*, utilizando-se o segmento nodal como fonte de explante, em meio de cultura WPM, maior número de gemas (4,3 e 2,1) foi obtido com 4,54 μM de TDZ e 6,66 μM de BAP, respectivamente, mas na presença do TDZ as brotações eram menores (GUTIÉRREZ *et al.*, 2011). O número de gemas por segmento nodal formadas neste ensaio foi superior no tratamento com adição de 0,4 μM de TDZ, porém não diferiu estatisticamente das concentrações 0,2 e 0,8 μM de TDZ adicionados ao meio de cultura. As variáveis: número de brotos/segmento nodal e tamanho médio dos brotos, não houve diferença estatística entre a testemunha e os tratamentos com os reguladores vegetais. Os tratamentos com cinetina não diferiu estatisticamente da testemunha para número de gemas/segmento nodal, tamanho e número de brotos/segmento nodal (TABELA 17).

TABELA 17 – EFEITO DA CINETINA E DO TDZ NA MULTIPLICAÇÃO, ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE SEGMENTOS NODAIS DE *A. mearnsii* APÓS 30 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* NO MEIO MS $\frac{3}{4}$.

Tratamentos	Nº gemas/ seg. nodal	Nº brotos/ seg. nodal	Tamanho [†] (cm)	Calos (%)	Enraizamento (%)
0	2,15 bc	1,39	2,4	0 c	37,14a
2,2 μM Cin	1,96c	1,4	2,82	2,5c	8,00b
4,4 μM Cin	2,22 bc	1,14	2,5	63,1b	2,85b
8,8 μM Cin	2,17 bc	1,34	2,83	89,2 a	10,83b
0,2 μM TDZ	3,47 ab	1,08	2,47	92,5 a	0,0 b
0,4 μM TDZ	3,59 a	1	2,85	100 a	0,0 b
0,8 μM TDZ	3,3 ab	1,08	2,92	95 a	0,0b
Sig.	0,001**	0,01**	0,295	0,00**	0,001**
Média	2,69	1,2	2,68	63,18	8,4
C.V. (%)	10,9	7,39	7,04	7,73	71,23

NOTA: [†] Tamanho médio dos brotos. ** Análise estatística ANOVA. Em cada coluna, as médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

FONTE: o autor, 2013.

Para formação de calos, a testemunha e os explantes cultivados na presença de 2,2 μM de cinetina não apresentaram diferença estatística, sendo nula ou baixa a porcentagem de calo nestes tratamentos. Porém, os tratamentos com diferentes concentrações de TDZ e 8,8 μM de cinetina apresentaram a maior porcentagem de calos na base dos explantes e diferiram estatisticamente da testemunha e dos tratamentos com adição de 2,2 e 4,4 μM de cinetina. O

resultado do tratamento com 4,4 μM de cinetina foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos, com 63% dos explantes apresentando calos em sua base (TABELA 17). Para número de brotos por segmento nodal não houve diferença significativa entre os tratamentos (TABELA 17). A formação de raízes nos explantes, dada pela porcentagem de enraizamento, foi influenciada pela presença dos reguladores vegetais no meio de cultura, pois houve diferença estatística entre a testemunha e os tratamentos com adição diferentes concentrações de cinetina e TDZ (TABELA 17). Neste ensaio o melhor resultado para multiplicação foi com a adição de 0,4 μM de TDZ, pois se obteve o maior número de gemas (3,59/segmento nodal).

4.3.4 Efeito de diferentes concentrações de BAP combinada com giberelina (GA_3)

Para as variáveis: tamanho (cm), número de brotos/ segmento nodal e porcentagem de enraizamento, não houve diferença estatística entre os tratamentos. Para número de gemas e porcentagem de calos houve diferença estatística entre a testemunha e os tratamentos com adição de BAP e GA_3 (TABELA 18). Segmentos nodais originaram a formação de múltiplas gemas na presença dos reguladores vegetais, independente da concentração de BAP utilizada. Nestes tratamentos, apesar de estatisticamente não haver diferença no número de brotos por segmento nodal e no tamanho, o tratamento com 2,2 μM BAP + 2 μM GA_3 promoveu maior desenvolvimento dos eixos caulinares (2,92 cm de comprimento) o que tornou mais fácil a individualização, gerando, em média, 2,83 brotos/segmento nodal, aos 30 dias de cultura (TABELA 18). Para louro-pardo, MANTOVANI *et al.* (2001) encontraram melhores resultados para multiplicação e alongamento de segmentos nodais, com o uso do meio de cultura WPM com adição de 0,44 μM de BAP combinado com 0,29 μM de GA_3 , que resultou em 6,85 gemas/explante.

TABELA 18 – COMBINAÇÕES DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP COM GIBERELINA AOS 30 DIAS DE CULTIVO.

Tratamentos (μ M)	Nº gemas/seg. nodal	Nº brotos/ seg. nodal	Tamanho (cm)	Calos (%)	Enraizamento(%)
0	1,90b	1,03a	2,47a	0,00a	27,5a
2,2 BAP + 2 GA ₃	3,13 a	2,83a	2,92a	95,0b	0,00a
11 BAP + 2 GA ₃	3,83 a	1,08a	2,51a	100,0b	22,5a
22BAP + 2 GA ₃	3,73 a	1,10a	2,44a	95,0b	0,00a
Sig.	0,00**	0,00**	0,13	0,00**	0,17
Média	3,14	1,23	2,36	72,5	12,5
C.V. (%)	7,85	63,12	6,34	5,07	82,72

NOTAS: Significância (Sig.) dada pela Análise estatística ANOVA. Em cada coluna, as médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

FONTE: o autor, 2013.

Na fase de multiplicação o melhor tratamento é o que permite maior número de brotos (explantes) saudáveis para o próximo subcultivo. O balanço entre a citocinina e a giberelina tem que ser adequado para formar novas gemas e alongar.

4.3.5 Efeito de diferentes concentrações de giberelina (GA₃) no alongamento de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*

O efeito do GA₃ no alongamento de segmentos nodais, aos 30 dias no meio de cultura, não foi evidenciado neste ensaio. Entre as concentrações testadas, não houve diferença significativa em nenhuma das variáveis mensuradas (TABELA 19). Houve um ligeiro crescimento caulinar e aumento de número de gemas por segmento nodal nas culturas que receberam GA₃, mas a taxa de enraizamento decresceu na presença do GA₃. Simões *et al.* (2012), em experimento testando o efeito de diferentes concentrações de GA₃ em segmentos nodais de *Piper hispidinervum*, constataram que a adição de 2,89 μ M de GA₃ em meio de cultura WPM com metade dos sais, induziu o maior alongamento caulinar, mas em concentrações maiores houve inibição do crescimento de raízes adventícias. Fráguas *et al.* (2004), observaram que a presença de ácido giberélico no meio de cultura WPM reduziu a formação e multiplicação dos brotos em segmentos nodais de *Ficus carica* e induziu o estiolamento e, quando aplicado em concentrações elevadas (17,32 e 23,09 μ M

de GA₃), induziu ao decréscimo no número de raízes e no peso da matéria fresca e seca do sistema radicular. A adição de GA₃ no meio de cultura pode ser eficaz no desenvolvimento e alongamento da parte aérea, porém pode diminuir ou impedir a formação de raízes adventícias (GEORGE *et al.*,2008).

TABELA 19 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO GIBERELICO (GA₃) NO ALONGAMENTO DOS BROTOS, AOS 30 DIAS.

Tratamentos	Tamanho (cm)	Nºgemas/ seg. nodal	Nºbrotos/ seg. nodal	Calo (%)	Enraizamento (%)
0	2,012	1,9	1,15	5,2	25,2
2,2 µM GA3	2,612	2,42	1,4	2,8	16,2
4,4 µM GA3	2,428	2,33	1,27	0	5,4
8,8 µM GA3	2,416	2,03	1,11	0	7,8
Sig.	0,259	0,135	0,066	0,279	0,177
Média	2,36	2,17	1,23	2	13,65
C.V. (%)	8,66	7,69	8,64	1,25	0,68

NOTA: Análise estatística ANOVA. Em cada coluna, as médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

FONTE: o autor, 2013.

4.3.6 INFLUÊNCIA DO TAMANHO DAS MUDAS MICROPROPAGADAS NA ACLIMATIZAÇÃO E RUSTIFICAÇÃO *EX VITRO*

Após 150 dias da instalação, para aclimatização *ex vitro*, a taxa de sobrevivência das mudas foi alta (90 e 97%, respectivamente) independente das classes de tamanhos testadas (TABELA 20). Não houve diferença estatística entre as variáveis taxa de sobrevivência e altura das mudas aos 150 dias de instalação no viveiro. Segundo Pereira *et al.* (2005), o principal obstáculo na fase de aclimatização é o baixo rendimento encontrado, pois podem ocorrer perdas significativas na transferência da sala de crescimento para as condições ambientais externas, por isso a fase de aclimatização não pode ser omitida para mudas de bananeira. Com *A. mearnsii*, fazendo a aclimatização na casa de enraizamento, esta perda foi menor que 10% e as mudas apresentavam, em média, 28 cm de altura, após 150 dias (TABELA 20). A aclimatização da espécie pode ser feita diretamente em casa de enraizamento com temperatura em torno de 27°C e 92% de umidade, por 40 dias. A rustificação pode ser em casa de sombra (sombrite 50%) por uma semana e depois a sol pleno até alcançarem altura suficiente para irem a campo.

TABELA 20– INFLUÊNCIA DO TAMANHO DAS MUDAS MICROPROPAGADAS NA ACLIMATIZAÇÃO E RUSTIFICAÇÃO, APÓS 150 DIAS.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Altura (cm)
2 a 4,9 cm	90	30,15
5 a 8 cm	97,5	26,7
Sig.*	0,224	0,415
Média	93,75	28,42
C. V. (%)	4,48	10,48

NOTA: *Análise estatística ANOVA (p<0,05).

FONTE: o autor, 2013.

4.4 CONCLUSÕES

Os resultados evidenciam que as citocininas utilizadas promovem a multiplicação de gemas axilares em explantes de *Acacia mearnsii*, mas na ausência destas, explantes provenientes de plântulas germinadas *in vitro*, responde bem na formação de novas gemas.

Na fase da multiplicação o melhor tratamento é o que permite maior número de explantes saudáveis para o próximo subcultivo. Portanto, tratamentos com maior número de brotos por segmento nodal são os mais recomendados.

Os tratamentos testemunhas (sem regulador vegetal) não diferem ou é estatisticamente superior aos tratamentos com reguladores vegetais para número de brotos por segmento nodal.

Dentre os reguladores vegetais testados, a adição de BAP na concentração 8,8 μM no meio de cultura MS $\frac{3}{4}$ proporciona a maior taxa de multiplicação de gemas (5,89/segmento nodal), mas para as outras variáveis medidas (número de brotos por segmento nodal, % de calo e % enraizamento) o tratamento testemunha é o mais recomendado.

O carvão ativado adicionado ao meio de cultura MS $\frac{3}{4}$, após tratamento com a BAP, foi o que promoveu maiores taxas de multiplicação (maior número de gemas por segmento nodal, brotos por segmento nodal, melhora a taxa de enraizamento e diminui a porcentagem de calos).

Para os tratamentos com adição de cinetina e TDZ, a melhor taxa de multiplicação é obtida com o uso de 0,4 μM de TDZ com 3,59 gemas/segmento nodal.

Entre as concentrações de BAP combinada com 2 μM GA₃, a melhor taxa de multiplicação é de 3,83 gemas/ segmento nodal, obtida com 11 μM de BAP e 2 μM GA₃.

O efeito do GA₃ no alongamento de segmentos nodais não é relevante, porém, influencia negativamente a taxa de enraizamento.

A taxa de sobrevivência na aclimatização/rustificação de *Acacia mearnsii* é alta (em média 93%) independente do tamanho inicial das mudas transferidas para o viveiro.

REFERENCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). **Anuário estatístico da ABRAF 2013**: ano base 2012. Brasília: ABRAF, 2013. 149 p.

BECK, S. L.; DUNLOP, R.; van STADEN, J. Meristem culture of *Acacia mearnsii*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 1, p.49-58, 2000.

BORGES JÚNIOR, N.; SOBORSA, R. C.; MARTINS-CODER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 493- 498, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v28n4/22599.pdf>>. Acesso 12 jun. 2012.

BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNING, J.; Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, vol. 33, n. 1, 2009.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v. 1. Brasília: Embrapa/CNPq, 1998. p. 87-132.

CORREIA, G.; GRAÇA, M. E. C. In vitro propagation of Black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild). **IPEF**, Piracicaba, n. 48/49, p.117-125, 1995.

COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E.P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.5, p.633-642, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010067622004000500001>. Acesso em: 30 de jan.2014.

DEWAN, A.; NANDA, K; SHRISH, G. C. In vitro micropropagation of *Acacia nilotica* subsp. *indica* Brenan via cotyledonary nodules. **Plant Cell Reports**, Delhi, India, v.12, p. 18-21, 1992.

DISARZ, R.; CORDER, M. P. M. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* De Wild. sob diferentes meios de cultura. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, p. 599-606, 2009.

FRÁGUAS, C. B., PASQUAL, M., PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, jan./fev. 2004.

GEORGE, E. F.; HALL, M. H.; DE KLERK, G. J. (eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture**, volume 1. 3 ed. Dordrecht: Springer, 2008. 501p.

GIRIJASHANKAR, V. Micropropagation of multipurpose medicinal tree *Acacia auriculiformis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, Hyderabad, India, vol. 5, n. 3, p. 462-466, 4 Feb. 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M, A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v.1. Brasília: Embrapa/CNPH, 1998. p. 183-260.

GUTIÉRREZ, I. E. M. DE; NEPOMUCENO, C. F.; LEDO, C. A. DA S.; SANTANA, J. R. F. de. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p.260-265, fev. 2011.

KAUR, K.; KANT, U. Clonal propagation of *Acacia catechu* Willd.by shoot tip culture. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 31, p. 143 – 145, 2000.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452p.

LANE, W. D. Regeneration of pear plants from shoot meristem: tips. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 16, p. 337-342, 1979.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALER, D. P.The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation.**Annals of Botany**, London, v. 62, p. 271-276, 1988.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; GUERRA, M. P.; HOPPE, J.M. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p.47-61, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, R.; SANTANA, J. R. F. DE; PEREIRA, F. D.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, L. C.; Effects of cytokinins on in vitro mineral accumulation and bud development in *Annona glabra* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, vol. 34, n. 6, p. 1439-1445, nov./dez. 2010. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S14130542010000600012&script=sci_arttext>. Acesso em: 21 jan. 2014.

PAULA, K. R. de. **Fatores ambientais e genéticos na produção de sementes de Acacia-negra**. 2005. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Programa de pós-graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PEREIRA, M. C. T.; NIETSCH, S.; FRANÇA, A. C.; NUNES, C.F.; LIMA, C.DE; GONÇALVES, V. D.; SALLES, B. P.; MORAIS, D. L. B.; KOJIBAYASHI, M.; Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes

condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 238-240, ago. 2005.

QUOIRIN, M.; BITTENCOURT, J. M.; ZANETTE, F.; OLIVEIRA, D. E. Effect of growth regulators on indirect organogenesis of *Acacia mearnsii* tissues cultured in vitro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, p. 101-105, 1998. Disponível em: <<http://www.cnpdia.embrapa.br/rbfv/pdfs/v10n2p101.pdf>> Acesso em: 17 fev. 2012.

QUOIRIN, M.; SILVA, M. C. MARTINS, K. G.; OLIVEIRA, D. E. Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 66, n. 3, p. 199-205, 2001.

ROVERSI, T.; MATTEI, V.; SILVEIRA JR., P.; FALCK, G. Superação da dormência em sementes de acácia negra (*Acacia mearnsii* Willd.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 2, p. 161-163, 2002.

SILVA, A. B. DA; PASQUAL, M. ; MACIEL, A. L. DE R.; DUTRA, L. F.; BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n. 2, p. 255-260, 2003.

SILVA, R. P. DA; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. DE A. A. Indução e cultivo in vitro de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azeda. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1331-1337, out. 2008.

SIMÕES, M. A.; VASCONCELOS, J. M.; OLIVEIRA, J. P. DE; BELTRÃO, R. T.; MANFIO, C. E.; FERMINO JÚNIOR, P. C. P.; RAPOSO, A. Efeito do ácido giberélico (GA₃) no alongamento *in vitro* de plântulas de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) durante a micropropagação. **Amazônia: Ciências & Desenvolvimento**, Belém, v. 7, n. 14, jan./jun. 2012. Disponível em: <http://siteantigo.bancoamazonia.com.br/bancoamazonia2/Revista/edicao_14/N_14_Efeito_do_Acido_Giberelido.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2014.

SKIRVIN, R. M. Fruticulture crops. In: CONGER, B. V. **Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1981. p. 51-139.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. DE; NERY, F. C.; VARGAS, D. P.; SILCA, D. R. G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, vol. 35, n.1, p.152-157, jan./fev. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141370542011000100019>. Acesso em: 21 jan. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; AMUTHA, S.; SELVARAJ, N.; *In vitro* propagation of *Acacia species* a review. **Plant Science**, Tamilnadu, Índia, v. 163, p. 663-671, 2002.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation**: technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 49-69. Disponível em: <<http://www.jstor.org/discover/10.2307/4292929?uid=3737664&uid=2134&uid=2&uid=70&uid=4&sid=21103271088227>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 DESINFESTAÇÃO E INTRODUÇÃO *IN VITRO*

Os resultados obtidos até o presente com a desinfestação e introdução *in vitro* de *Acacia mearnsii* ainda são inconclusivos, havendo a necessidade de serem testados outros fatores, como por exemplo:

- antioxidantes pra diminuir a oxidação / necrose dos explantes em especial o carvão ativado que já mostrou bons resultados na fase de multiplicação com explantes germinados *in vitro*;
- identificação e controle das colônias de bactérias com antibiótico(s);
- uso de outros fungicidas aliados a antibióticos nos pré-tratamentos com a planta matriz;
- trocar o meio de cultura semanalmente para evitar necrose e deficiência nutricional;
- fazer uso de carvão ativado no meio de cultura (evitar a presença de oxidação fenólica e possivelmente diminuir a taxa de necrose);
- utilizar soluções de hipoclorito de cálcio em diferentes concentrações e aumentar o tempo de imersão no álcool etílico 70%;
- tratamentos de desinfestação em um único material genético e depois fazer as adaptações para outros clones.

5.2 MICROPROPAGAÇÃO A PARTIR DE PLÂNTULAS CRESCIDAS *IN VITRO*

A micropropagação através de plântulas germinadas *in vitro*, com meio de cultura MS $\frac{3}{4}$, resultou em alta taxa de multiplicação, enraizamento e sobrevivência na aclimatização.

Após 30 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP, estes explantes foram subcultivados em carvão ativado, gerando as melhores taxas de multiplicação. Como não houve diferença estatística entre os tratamentos, deve-se testar o cultivo desta espécie em meio de cultura com adição carvão ativado, sem nenhum tratamento prévio com regulador vegetal, na fase de multiplicação.

As melhores respostas para número de gemas e brotos por segmento nodal foram obtidas em subcultivo com adição de 2 g.L^{-1} de carvão ativado no meio de cultura, sendo que a taxa de multiplicação duplicou quando comparada com os outros tratamentos testados. Portanto deve-se testar inocular em meio com carvão ativado, sem passar previamente por nenhum tratamento com regulador vegetal, para confirmar a superioridade das respostas morfogênicas dos explantes para este antioxidante.

A aclimatização da espécie pode ser feita com a transferência para casa de enraizamento com temperatura em torno de 27°C e 92% de umidade, por 40 dias. A rustificação pode ser em casa de sombra (sombrite 50%) por uma semana e depois a sol pleno até alcançarem altura suficiente para irem a campo.

ANEXO

MEIO DE CULTURA

MURASHIGE AND SKOOG 1962 (MS)

Em mg.L ⁻¹		pipetar para 1L
Macronutrientes		
1650	NH ₄ NO ₃	20,6 ml
1900	KNO ₃	19 ml
170	KH ₂ PO ₄	10 ml
440	CaCl ₂ .2H ₂ O	20 ml
370	MgSO ₄ .7H ₂ O	14,8 ml
27,8	FeSO ₄ .7H ₂ O	10 ml (+EDTA)
37,3	Na ₂ EDTA	
Micronutrientes		
16,9	MnSO ₄ .H ₂ O	10 ml da solução
8,6	ZnSO ₄ .7H ₂ O	
0,25	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	
0,025	CuSO ₄ .5H ₂ O	
0,025	CoCl ₂ .6H ₂ O	
6,2	H ₃ BO ₃	
0,83	KI	
Vitaminas		
0,5	Ácido nicotínico	10 ml
0,5	Piridoxina	10 ml
0,1	Tiamina	0,2 ml
100,0	Meso Inositol	10 ml
2,0	Glicina	10 ml
30 g.L ⁻¹	Sacarose	
8 g.L ⁻¹	Agar	
pH	5,8	

Solução nutritiva proposta por Bolle Jones, utilizada para fertirrigação do mini jardim clonal:

Tabela 1. Composição das soluções nutritivas (ml sol. Estoque/L solução de trabalho) utilizadas no experimento

Sol. estoque	Conc.	Comp.	-N	-P	-K	-Ca	-Mg	-S	-B	-Cu	-Fe	-Mn	-Zn
NaH_2PO_4	M	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	M	2	-	2	2	-	2	2	2	2	2	2	2
KNO_3	M	1	-	1	-	3	-	2	1	1	1	1	1
K_2SO_4	0,5M	2	2	2	-	-	3	-	2	2	2	2	2
MgSO_4	0,5M	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	-	-	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	M	1,5	-	1,5	2	2,5	2	-	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01M	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KH_2PO_4	M	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	0,5M	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-
NaNO_3	M	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
¹ Solução a		1	1	1	1	1	1	1	a-B	a-Cu	1	a-Mn	a-Zn
² Sol. Fe-EDTA		1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1

¹ Composição da solução a: 0,4121g de H_3BO_3 ; 1,75g de MnSO_4 ; 0,24968g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,0431g de MoO_3 e 0,28755g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

² Composição da solução Fe-EDTA: 26,1g de Fe-EDTA; 89,2ml de NaOH N e 24,9g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, por litro de solução.

Observação: As soluções a-B, a-Cu, a-Mn e a-Zn, são semelhantes à solução a, omitindo-se, respectivamente, H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

ANEXOS: Análises estatísticas

Capítulo 2 – Desinfestação e introdução *in vitro*

ANEXO1 (A)

Experimento em DBC fatorial. Tratamentos: 0,25% ou 0,4% (p/v) de HgCl_2 por 5, 10 e 15 minutos; NaOCl 2% ou 3% (v/v) por 10 minutos.

Análise com 7 dias de introdução *in vitro* para variável sobrevivência.

ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Sobrev

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1,507 ^a	11	,137	2,241	,034
Intercept	15,413	1	15,413	252,218	,000
NaOCl	,053	1	,053	,873	,356
HgCl ₂	,083	1	,083	1,364	,251
Tempo	,112	2	,056	,914	,410
HgCl ₂ * Tempo	,032	2	,016	,259	,773
NaOCl * HgCl ₂ * Tempo	,502	2	,251	4,105	,025
NaOCl * Tempo	,162	2	,081	1,323	,279
NaOCl * HgCl ₂	,563	1	,563	9,218	,004
Error	2,200	36	,061		
Total	19,120	48			
Corrected Total	3,707	47			

a. R Squared = ,406 (Adjusted R Squared = ,225)

ANEXO 1(B)

Experimento em DBC fatorial. Tratamentos: 0,25% ou 0,4% (p/v) de HgCl_2 por 5, 10 e 15 minutos; NaOCl 2% ou 3% (v/v) por 10 minutos.

Análises com 12 dias de introdução *in vitro*

Contaminação por fungos:

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Fungos	Based on Mean	2,508	1	46	,120
	Based on Median	1,306	1	46	,259
	Based on Median and with adjusted df	1,306	1	40,470	,260
	Based on trimmed mean	2,424	1	46	,126

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Fungos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,889 ^a	11	,081	1,317	,255
Intercept	13,021	1	13,021	212,104	,000
NaOCl	,041	1	,041	,665	,420
HgCl ₂	,521	1	,521	8,484	,006
Tempo	,072	2	,036	,584	,563
NaOCl * HgCl ₂	,141	1	,141	2,294	,139
NaOCl * Tempo	,002	2	,001	,014	,987
HgCl ₂ * Tempo	,072	2	,036	,584	,563
NaOCl * HgCl ₂ * Tempo	,042	2	,021	,339	,714
Error	2,210	36	,061		
Total	16,120	48			
Corrected Total	3,099	47			

a. R Squared = ,287 (Adjusted R Squared = ,069)

2. HgCl₂

Dependent Variable:Fungos

HgCl ₂	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
HgCl ₂ 0,25%	,625	,051	,522	,728
HgCl ₂ 0,40%	,417	,051	,314	,519

Variável: porcentagem de sobrevivência

ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Sobrev

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,590 ^a	11	,054	1,583	,146
Intercept	1,470	1	1,470	43,377	,000
NaOCl	,083	1	,083	2,459	,126
HgCl ₂	,163	1	,163	4,820	,035
Tempo	,065	2	,033	,959	,393
NaOCl * HgCl ₂	,030	1	,030	,885	,353
NaOCl * Tempo	,152	2	,076	2,238	,121
HgCl ₂ * Tempo	,062	2	,031	,910	,412
NaOCl * HgCl ₂ * Tempo	,035	2	,018	,516	,601
Error	1,220	36	,034		
Total	3,280	48			
Corrected Total	1,810	47			

a. R Squared = ,326 (Adjusted R Squared = ,120)

2. HgCl₂

Dependent Variable:Sobrev_12d

HgCl ₂	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
HgCl ₂ 0,25%	,117	,038	,040	,193
HgCl ₂ 0,40%	,233	,038	,157	,310

NECROSE (ANOVA)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:necrose

Source	Type III Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2400,000 ^a	11	218,182	2,805	,010
Intercept	1200,000	1	1200,000	15,429	,000
NaOCl	,000	1	,000	,000	1,000
HgCl ₂	533,333	1	533,333	6,857	,013
Tempo	650,000	2	325,000	4,179	,023
HgCl ₂ * Tempo	416,667	2	208,333	2,679	,082
NaOCl * HgCl ₂	133,333	1	133,333	1,714	,199
NaOCl * Tempo	350,000	2	175,000	2,250	,120
NaOCl * HgCl ₂ * Tempo	316,667	2	158,333	2,036	,145
Error	2800,000	36	77,778		
Total	6400,000	48			
Corrected Total	5200,000	47			

a. R Squared = ,462 (Adjusted R Squared = ,297)

HgCl₂

Dependent Variable:necrose

HgCl ₂	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0,25%	1,667	1,800	-1,984	5,318
0,40%	8,333	1,800	4,682	11,984

ANEXO 1 (C)

Experimento em DBC fatorial. Tratamentos: 0,25% ou 0,4% (p/v) de HgCl_2 por 5, 10 e 15 minutos; NaOCl 2% ou 3% (v/v) por 10 minutos.

Análises com 30 dias de introdução *in vitro*

Contaminação por fungos:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Fungos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,849 ^a	11	,077	1,134	,365
Intercept	14,741	1	14,741	216,600	,000
NaOCl	,101	1	,101	1,482	,231
HgCl_2	,368	1	,368	5,400	,026
Tempo	,062	2	,031	,453	,639
NaOCl * HgCl_2	,141	1	,141	2,069	,159
NaOCl * Tempo	,022	2	,011	,159	,853
HgCl_2 * Tempo	,095	2	,048	,698	,504
NaOCl * HgCl_2 * Tempo	,062	2	,031	,453	,639
Error	2,450	36	,068		
Total	18,040	48			
Corrected Total	3,299	47			

a. R Squared = ,257 (Adjusted R Squared = ,030)

2. HgCl_2

Dependent Variable:Fungos

HgCl_2	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
HgCl_2 0,25%	,642	,053	,534	,750
HgCl_2 0,40%	,467	,053	,359	,575

Porcentagem de necrose

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Necrose

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,402 ^a	11	,037	1,626	,133
Intercept	,908	1	,908	40,333	,000
NaOCl	,021	1	,021	,926	,342
HgCl ₂	,041	1	,041	1,815	,186
Tempo	,155	2	,078	3,444	,043
NaOCl * HgCl ₂	,008	1	,008	,333	,567
NaOCl * Tempo	,012	2	,006	,259	,773
HgCl ₂ * Tempo	,102	2	,051	2,259	,119
NaOCl * HgCl ₂ * Tempo	,065	2	,033	1,444	,249
Error	,810	36	,023		
Total	2,120	48			
Corrected Total	1,213	47			

a. R Squared = ,332 (Adjusted R Squared = ,128)

3. Tempo

Dependent Variable:Necrose

Tempo	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
5 min	,075	,037	-,001	,151
10 min	,125	,037	,049	,201
15 min	,213	,037	,136	,289

Necrose - Teste de médias

Bonferroni a 5%

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Necrose

(I) Tempo	(J) Tempo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
5 min	10 min	-,050	,053	1,000	-,183	,083
	15 min	-,138*	,053	,041	-,271	-,004
10 min	5 min	,050	,053	1,000	-,083	,183
	15 min	-,088	,053	,323	-,221	,046
15 min	5 min	,138*	,053	,041	,004	,271
	10 min	,088	,053	,323	-,046	,221

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Tukey a 5%

Necrose

TukeyHSD^{a,b}

Tempo	N	Subset	
		1	2
5 min	16	,0750	
10 min	16	,1250	,1250
15 min	16		,2125
Sig.		,617	,238

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,023.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 16,000.

b. Alpha = ,05.

Porcentagem de sobrevivência

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Sobrev_30_d

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,343 ^a	11	,031	2,038	,053
Intercept	,188	1	,188	12,273	,001
NaOCl	,041	1	,041	2,673	,111
HgCl ₂	,101	1	,101	6,600	,014
Tempo	,035	2	,018	1,145	,329
NaOCl * HgCl ₂	,008	1	,008	,491	,488
NaOCl * Tempo	,062	2	,031	2,018	,148
HgCl ₂ * Tempo	,032	2	,016	1,036	,365
NaOCl * HgCl ₂ * Tempo	,065	2	,033	2,127	,134
Error	,550	36	,015		
Total	1,080	48			
Corrected Total	,893	47			

a. R Squared = ,384 (Adjusted R Squared = ,195)

2. HgCl₂

Dependent Variable: Sobrev_30d

HgCl ₂	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
HgCl ₂ 0,25%	,017	,025	-,035	,068
HgCl ₂ 0,40%	,108	,025	,057	,160

ANEXO 2 - EFEITO DO PPM UTILIZADO COMO SOLUÇÃO DESINFESTANTE E ADICIONADO AO MEIO DE CULTURA

Experimento em DBC fatorial. Tratamentos: 1 e 2 ml.L⁻¹ de PPM® no meio de cultura, imersão em 40 ml.L⁻¹ por 4, 6 e 8 horas.

Análise estatística com 30 dias de introdução *in vitro*

ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Fungos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3800,000 ^a	5	760,000	3,547	,009
Intercept	30000,000	1	30000,000	140,000	,000
Meio	8,333	1	8,333	,039	,845
Tempo	3087,500	2	1543,750	7,204	,002
Meio * Tempo	704,167	2	352,083	1,643	,206
Error	9000,000	42	214,286		
Total	42800,000	48			
Corrected Total	12800,000	47			

a. R Squared = ,297 (Adjusted R Squared = ,213)

Teste de Tukey

FungosTukey HSD^{a,b}

Tempo	N	Subset	
		1	2
4 h	16	16,2500	
6 h	16	23,1250	23,1250
8 h	16		35,6250
Sig.		,388	,052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) =

214,286.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 16,000.

b. Alpha = ,05.

Variável: porcentagem de necrose**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Necrose

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1800,000 ^a	5	360,000	2,130	,081
Intercept	14700,000	1	14700,000	86,958	,000
Meio	300,000	1	300,000	1,775	,190
Tempo	1350,000	2	675,000	3,993	,026
Meio * Tempo	150,000	2	75,000	,444	,645
Error	7100,000	42	169,048		
Total	23600,000	48			
Corrected Total	8900,000	47			

a. R Squared = ,202 (Adjusted R Squared = ,107)

Teste de médias – Tukey a 5%

NecroseTukey HSD^{a,b}

Tempo	N	Subset	
		1	2
4 h	16	13,7500	25,0000
6 h	16	13,7500	
8 h	16		
Sig.		1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) =

169,048.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 16,000.

b. Alpha = ,05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Necr_Ox_fen

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1518,750 ^a	5	303,750	1,602	,181
Intercept	45018,750	1	45018,750	237,462	,000
Meio	102,083	1	102,083	,538	,467
Tempo	150,000	2	75,000	,396	,676
Meio * Tempo	1266,667	2	633,333	3,341	,045
Error	7962,500	42	189,583		
Total	54500,000	48			
Corrected Total	9481,250	47			

a. R Squared = ,160 (Adjusted R Squared = ,060)

ANEXO 3 - EFEITO DO PPM UTILIZADO COMO SOLUÇÃO DESINFESTANTE E ADICIONADO AO MEIO DE CULTURA

Experimento em DBC. Tratamentos: 1 ml.L⁻¹ de PPM® no meio de cultura, imersão em 40 ml.L⁻¹ por 1, 2, 3 e 4 horas.

Variável: contaminação por fungos

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Fungos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1395,089 ^a	9	155,010	1,208	,349
Intercept	232232,143	1	232232,143	1809,391	,000
Tratamento	267,857	3	89,286	,696	,567
Blocos	1127,232	6	187,872	1,464	,246
Error	2310,268	18	128,348		
Total	235937,500	28			
Corrected Total	3705,357	27			

a. R Squared = ,377 (Adjusted R Squared = ,065)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Bacterias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8867,188 ^a	9	985,243	2,707	,034
Intercept	50362,723	1	50362,723	138,373	,000
Tratamento	597,098	3	199,033	,547	,657
Blocos	8270,089	6	1378,348	3,787	,013
Error	6551,339	18	363,963		
Total	65781,250	28			
Corrected Total	15418,527	27			

a. R Squared = ,575 (Adjusted R Squared = ,363)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Necrose

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6077,009 ^a	9	675,223	1,720	,156
Intercept	59202,009	1	59202,009	150,839	,000
Tratamento	2739,955	3	913,318	2,327	,109
Blocos	3337,054	6	556,176	1,417	,262
Error	7064,732	18	392,485		
Total	72343,750	28			
Corrected Total	13141,741	27			

a. R Squared = ,462 (Adjusted R Squared = ,194)

ANEXO 4 - EFEITO DO USO DE HgCl₂ PARA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *A. mearnsii*, COMBINADO COM NaOCl OU HCl.

Experimento em DBC fatorial. Tratamentos: HgCl₂ a 0,3% por 10 ou 15 minutos, sozinho ou combinado com NaOCl a 2% (v/v) por 10 minutos ou HCl pH a 3,5 por 2 minutos de imersão, aos 7 dias.

Variável contaminação por bactérias

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Bacteria

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6270,833 ^a	9	696,759	3,822	,006
Intercept	123520,833	1	123520,833	677,600	,000
Tempo	,000	1	,000	,000	1,000
Produto	3010,417	2	1505,208	8,257	,002
Bloco	1479,167	4	369,792	2,029	,129
Tempo * Produto	1781,250	2	890,625	4,886	,019
Error	3645,833	20	182,292		
Total	133437,500	30			
Corrected Total	9916,667	29			

a. R Squared = ,632 (Adjusted R Squared = ,467)

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Bacteria

Produto	(I) Tempo	(J) Tempo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
sem	HgCl2 10'	HgCl2 15'	2,500	8,539	,773
	HgCl2 15'	HgCl2 10'	-2,500	8,539	,773
NaOCl	HgCl2 10'	HgCl2 15'	-20,000 [*]	8,539	,030
	HgCl2 15'	HgCl2 10'	20,000 [*]	8,539	,030
HCl	HgCl2 10'	HgCl2 15'	17,500	8,539	,054
	HgCl2 15'	HgCl2 10'	-17,500	8,539	,054

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Bacteria

Tempo	(I) Produto	(J) Produto	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
HgCl2 10'	sem	NaOCl	32,500 [*]	8,539	,003
		HCl	-7,500	8,539	1,000
	NaOCl	sem	-32,500 [*]	8,539	,003
		HCl	-40,000 [*]	8,539	,000
	HCl	sem	7,500	8,539	1,000
		NaOCl	40,000 [*]	8,539	,000
HgCl2 15'	sem	NaOCl	10,000	8,539	,766
		HCl	7,500	8,539	1,000
	NaOCl	sem	-10,000	8,539	,766
		HCl	-2,500	8,539	1,000
	HCl	sem	-7,500	8,539	1,000
		NaOCl	2,500	8,539	1,000

Variável Necrose

ANEXO 4 - EFEITO DO USO DE HCL PARA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *A. mearnsii*

Experimento em DBC. Tratamentos: 1 ml.L⁻¹ de PPM® no meio de cultura, desinfestação com imersão em HCl pH 3,5 por 5, 10, 15 e 20 minutos aos 15 dias de introdução *in vitro*.

ANOVA- contaminação por bactérias

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: bacteria

Source	Type III Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8207,143 ^a	9	911,905	2,386	,056
Intercept	154514,286	1	154514,286	404,336	,000
HOCl	371,429	3	123,810	,324	,808
blocos	7835,714	6	1305,952	3,417	,020
Error	6878,571	18	382,143		
Total	169600,000	28			
Corrected Total	15085,714	27			

a. R Squared = ,544 (Adjusted R Squared = ,316)

bacteria

TukeyHSD^{a,b}

HOCl	N	Subset
		1
5 min	7	68,5714
10 min	7	74,2857
20 min	7	75,7143
15 min	7	78,5714
Sig.		,775

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean

Square(Error) = 382,143.

a. Uses Harmonic Mean Sample

Size = 7,000.

b. Alpha = ,05.

ANEXO 5 - EFEITO DO USO DE HgCl₂ PARA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *A. mearnsii*, COMBINADO COM NaOCl OU HCl.

ANOVA- contaminação por bactérias

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Bacteria

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6270,833 ^a	9	696,759	3,822	,006
Intercept	123520,833	1	123520,833	677,600	,000
Tempo	,000	1	,000	,000	1,000
Produto	3010,417	2	1505,208	8,257	,002
Bloco	1479,167	4	369,792	2,029	,129
Tempo * Produto	1781,250	2	890,625	4,886	,019
Error	3645,833	20	182,292		
Total	133437,500	30			
Corrected Total	9916,667	29			

a. R Squared = ,632 (Adjusted R Squared = ,467)

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Bacteria

Produto	(I) Tempo	(J) Tempo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
sem	HgCl2 10'	HgCl2 15'	2,500	8,539	,773
	HgCl2 15'	HgCl2 10'	-2,500	8,539	,773
NaOCl	HgCl2 10'	HgCl2 15'	-20,000 [*]	8,539	,030
	HgCl2 15'	HgCl2 10'	20,000 [*]	8,539	,030
HCl	HgCl2 10'	HgCl2 15'	17,500	8,539	,054
	HgCl2 15'	HgCl2 10'	-17,500	8,539	,054

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Bacteria

Tempo	(I) Produto	(J) Produto	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
HgCl2 10'	sem	NaOCl	32,500 [*]	8,539	,003
		HCl	-7,500	8,539	1,000
	NaOCl	sem	-32,500 [*]	8,539	,003
		HCl	-40,000 [*]	8,539	,000
	HCl	sem	7,500	8,539	1,000
		NaOCl	40,000 [*]	8,539	,000
HgCl2 15'	sem	NaOCl	10,000	8,539	,766
		HCl	7,500	8,539	1,000
	NaOCl	sem	-10,000	8,539	,766
		HCl	-2,500	8,539	1,000
	HCl	sem	-7,500	8,539	1,000
		NaOCl	2,500	8,539	1,000

Necrose

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Necrose

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6119,792 ^a	9	679,977	1,047	,440
Intercept	103546,875	1	103546,875	159,431	,000
Tempo	3796,875	1	3796,875	5,846	,025
Produto	1343,750	2	671,875	1,034	,374
Bloco	697,917	4	174,479	,269	,895
Tempo * Produto	281,250	2	140,625	,217	,807
Error	12989,583	20	649,479		
Total	122656,250	30			
Corrected Total	19109,375	29			

a. R Squared = ,320 (Adjusted R Squared = ,014)

CAPÍTULO 2 – MICROPROPAGAÇÃO DE ACÁCIA NEGRA

ANEXO 7

Teste de multiplicação com adição de diferentes concentrações de BAP

Variável: Número de gemas

Teste de homogeneidade de variâncias

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Gemas	Based on Mean	,777	3	16	,524
	Based on Median	,267	3	16	,848
	Based on Median and with adjusted df	,267	3	11,823	,848
	Based on trimmed mean	,731	3	16	,549

ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Gemas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	13,681 ^a	7	1,954	4,096	,016
Intercept	481,671	1	481,671	1009,322	,000
Tratamento	10,167	3	3,389	7,102	,005
Bloco	3,514	4	,878	1,841	,186
Error	5,727	12	,477		
Total	501,079	20			
Corrected Total	19,408	19			

a. R Squared = ,705 (Adjusted R Squared = ,533)

Teste de Tukey

Gemas

Tukey HSD^{a,b}

Tratamento	N	Subset	
		1	2
2,2 uM BAP	5	4,1360	
sem BAP	5	4,3260	
4,4 uM BAP	5	5,2800	5,2800
8,8 uM BAP	5		5,8880
Sig.		,091	,527

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,477.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Variável: Número de explantes

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
N_brotações	Based on Mean	,833	3	12	,501
	Based on Median	,800	3	12	,517
	Based on Median and with adjusted df	,800	3	7,426	,530
	Based on trimmed mean	,833	3	12	,501

ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: N_Explantes

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7,189 ^a	7	1,027	13,332	,000
Intercept	58,927	1	58,927	764,927	,000
Tratamento	6,834	3	2,278	29,569	,000
Bloco	,355	4	,089	1,154	,379
Error	,924	12	,077		
Total	67,041	20			
Corrected Total	8,114	19			

a. R Squared = ,886 (Adjusted R Squared = ,820)

N_ExplantesTukey HSD^{a,b}

Tratamento	N	Subset	
		1	2
8,8 uM BAP	5	1,3380	2,7280
2,2 uM BAP	5	1,3980	
4,4 uM BAP	5	1,4020	
sem BAP	5		
Sig.		,983	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,077.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Variável: porcentagem de calo

Test of Homogeneity of Variance^a

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Calo	Based on Mean	1,400	2	9	,296
	Based on Median	,200	2	9	,822
	Based on Median and with adjusted df	,200	2	4,412	,826
	Based on trimmed mean	1,032	2	9	,395

a. Calo is constant when Tratamento = 8,8 uM BAP. It has been omitted.

ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Calo

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	28617,188 ^a	7	4088,170	32,038	,000
Intercept	96257,812	1	96257,812	754,347	,000
Tratamento	27648,437	3	9216,146	72,224	,000
Bloco	968,750	4	242,187	1,898	,176
Error	1531,250	12	127,604		
Total	126406,250	20			
Corrected Total	30148,438	19			

a. R Squared = ,949 (Adjusted R Squared = ,920)

Teste de comparação de médias - Tukey

Calo

Tukey HSD^{a,b}

Tratamento	N	Subset	
		1	2
sem BAP	5	5,0000	
2,2 uM BAP	5		90,0000
4,4 uM BAP	5		90,0000
8,8 uM BAP	5		92,5000
Sig.		1,000	,985

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 127,604.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Variável: porcentagem de enraizamento

Test of Homogeneity of Variance ^a					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Enraiz	Based on Mean	1,929	2	9	,201
	Based on Median	1,333	2	9	,311
	Based on Median and with adjusted df	1,333	2	9,000	,311
	Based on trimmed mean	1,879	2	9	,208

a. Enraiz is constant when Tratamento = 8,8 uM BAP. It has been omitted.

Enraizam

Tukey HSD^{a,b}

Tratamento	N	Subset	
		1	2
8,8 uM BAP	5	,0000	80,0000
2,2 uM BAP	5	5,0000	
4,4 uM BAP	5	7,5000	
sem BAP	5		
Sig.		,805	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 173,177.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Após 45 dias em subcultivo com meio de cultura suplementado com carvão ativado.

Variável: Número de gemas

Teste de homogeneidade de variâncias

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
N_Gemas	Based on Mean	3,093	3	12	,068
	Based on Median	1,883	3	12	,186
	Based on Median and with adjusted df	1,883	3	5,358	,244
	Based on trimmed mean	2,786	3	12	,086

ANOVA: número de gemas

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: N_Gemas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	612,000 ^a	6	102,000	,556	,755
Intercept	64770,250	1	64770,250	353,346	,000
Tratamento	372,750	3	124,250	,678	,587
Blocos	239,250	3	79,750	,435	,733
Error	1649,750	9	183,306		
Total	67032,000	16			
Corrected Total	2261,750	15			

a. R Squared = ,271 (Adjusted R Squared = -,216)

Estimates

Dependent Variable: N_Gemas

Tratamento	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
sem BAP	64,500	6,770	49,186	79,814
2,2 uMBAP	57,000	6,770	41,686	72,314
4,4 uMBAP	70,500	6,770	55,186	85,814
8,8 uMBAP	62,500	6,770	47,186	77,814

Test T comparando sem carvão e com carvão (todos os tratam)

Group Statistics

trat	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
num_gemas sem carvão	4	4,9100	,82191	,41095
com carvão	4	7,9525	,69370	,34685

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference		Lower	Upper
num_gemas	Equal variances assumed	,621	,461	-5,658	6	,001	-3,04250	,53776		-4,35836	-1,72664
	Equal variances not assumed			-5,658	5,835	,001	-3,04250	,53776		-4,36741	-1,71759

Independent Samples Test						
		Levene's Test for Equality of Variances				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
num_gemas	Equal variances assumed	,621	,461	-5,658	6	,001
	Equal variances not assumed			-5,658	5,835	,001

Variável: Número de explantes

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: N_brotações

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	313,000 ^a	6	52,167	2,339	,121
Intercept	7832,250	1	7832,250	351,134	,000
Tratamento	240,750	3	80,250	3,598	,059
Blocos	72,250	3	24,083	1,080	,406
Error	200,750	9	22,306		
Total	8346,000	16			
Corrected Total	513,750	15			

a. R Squared = ,609 (Adjusted R Squared = ,349)

ANEXO 8 – Análise estatística do teste de diferentes concentrações de cinetina e TDZ na multiplicação de segmentos nodais de acácia negra.

ANOVA – número de gemas

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: n_gemas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	17,604 ^a	10	1,760	4,087	,002
Intercept	254,263	1	254,263	590,312	,000
Tratam	15,520	6	2,587	6,005	,001
bloco	2,084	4	,521	1,209	,333
Error	10,337	24	,431		
Total	282,204	35			
Corrected Total	27,941	34			

a. R Squared = ,630 (Adjusted R Squared = ,476)

N_Gemas

Tukey HSD^{a, b}

Tratamento	N	Subset		
		1	2	3
2,2 Cin	5	1,9600		
sem reguladores	5	2,1536	2,1536	
8,8 Cin	5	2,1750	2,1750	
4,4 Cin	5	2,2167	2,2167	
0,8 TDZ	5		3,2988	3,2988
0,2 TDZ	5		3,4714	3,4714
0,4 TDZ	5			3,5917
Sig.		,996	,055	,992

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,444.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Test of Homogeneity of Variance^a

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
N_Explantes	Based on Mean	1,578	5	24	,204
	Based on Median	,621	5	24	,685
	Based on Median and with adjusted df	,621	5	19,773	,685
	Based on trimmed mean	1,495	5	24	,228

a. N_Explantes is constant when Tratamento = 0,4 TDZ. It has been omitted.

N_ExplantesTukey HSD^{a,b}

Tratamento	N	Subset
		1
0,4 TDZ	5	1,0000
0,2 TDZ	5	1,0750
0,8 TDZ	5	1,0750
4,4 Cin	5	1,1358
8,8 Cin	5	1,3500
sem reguladores	5	1,3928
2,2 Cin	5	1,3950
Sig.		,055

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,040.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Calos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	57884,880 ^a	6	9647,480	80,815	,000
Intercept	139711,137	1	139711,137	1170,339	,000
Tratamento	57884,880	6	9647,480	80,815	,000
Error	3342,545	28	119,377		
Total	200938,563	35			
Corrected Total	61227,425	34			

a. R Squared = ,945 (Adjusted R Squared = ,934)

CalosTukey HSD^{a,b}

Tratamento	N	Subset		
		1	2	3
sem reguladores	5	,0000	63,0952	89,1667
2,2 Cin	5	2,5000		
4,4 Cin	5			
8,8 Cin	5			
0,2 TDZ	5			
0,8 TDZ	5			
0,4 TDZ	5			
Sig.		1,000	1,000	,703

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 119,377.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Calos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	57884,880 ^a	6	9647,480	80,815	,000
Intercept	139711,137	1	139711,137	1170,339	,000
Tratamento	57884,880	6	9647,480	80,815	,000
Error	3342,545	28	119,377		
Total	200938,563	35			
Corrected Total	61227,425	34			

a. R Squared = ,945 (Adjusted R Squared = ,934)

CalosTukey HSD^{a,b}

Tratamento	N	Subset		
		1	2	3
sem reguladores	5	,0000	63,0952	89,1667
2,2 Cin	5	2,5000		
4,4 Cin	5			
8,8 Cin	5			
0,2 TDZ	5			
0,8 TDZ	5			
0,4 TDZ	5			100,0000
Sig.		1,000	1,000	,703

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 119,377.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Enraizamento

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5373,180 ^a	6	895,530	5,004	,001
Intercept	2472,401	1	2472,401	13,815	,001
Tratamento	5373,180	6	895,530	5,004	,001
Error	5011,151	28	178,970		
Total	12856,732	35			
Corrected Total	10384,331	34			

a. R Squared = ,517 (Adjusted R Squared = ,414)

EnraizamentoTukey HSD^{a, b}

Tratamento	N	Subset	
		1	2
0,2 TDZ	5	,0000	
0,4 TDZ	5	,0000	
0,8 TDZ	5	,0000	
4,4 Cin	5	2,8571	
2,2 Cin	5	8,0000	10,8333
8,8 Cin	5	10,8333	
sem reguladores	5		
Sig.		,855	,057

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 178,970.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Anexo 9: Efeito de diferentes concentrações de BAP combinado com giberelina (GA3) na multiplicação de segmentos nodais de *A. mearnsii*

Variável: Número de gemas

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: n_gemas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	13,073 ^a	7	1,868	6,121	,003
Intercept	198,135	1	198,135	649,334	,000
tratamento	11,745	3	3,915	12,831	,000
Blocos	1,328	4	,332	1,088	,406
Error	3,662	12	,305		
Total	214,870	20			
Corrected Total	16,735	19			

a. R Squared = ,781 (Adjusted R Squared = ,654)

n_gemasTukey HSD^{a, b}

tratamento	N	Subset	
		1	2
testemunha	5	1,9040	
2,2 BAP+2 GA3	5		3,1280
22 BAP+2 GA3	5		3,7300
11 BAP+2 GA3	5		3,8280
Sig.		1,000	,240

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,305.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:calos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	35312,500 ^a	7	5044,643	74,505	,000
Intercept	105125,000	1	105125,000	1552,615	,000
tratamento	35125,000	3	11708,333	172,923	,000
Blocos	187,500	4	46,875	,692	,611
Error	812,500	12	67,708		
Total	141250,000	20			
Corrected Total	36125,000	19			

a. R Squared = ,978 (Adjusted R Squared = ,964)

calosTukey HSD^{a, b}

tratamento	N	Subset	
		1	2
testemunha	5	,0000	
2,2 BAP+2 GA3	5		95,0000
22 BAP+2 GA3	5		95,0000
11 BAP+2 GA3	5		100,0000
Sig.		1,000	,773

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 67,708.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

b. Alpha = ,05.

**ANEXO 10: Efeito de diferentes concentrações de giberelina (GA₃)
no alongamento de segmentos nodais de *Acacia mearnsii***

Nenhuma variável deu significativo

ANEXO 11 : Aclimatização testando diferentes tamanhos.

Nenhuma variável deu significativo

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Necrose

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6119,792 ^a	9	679,977	1,047	,440
Intercept	103546,875	1	103546,875	159,431	,000
Tempo	3796,875	1	3796,875	5,846	,025
Produto	1343,750	2	671,875	1,034	,374
Bloco	697,917	4	174,479	,269	,895
Tempo * Produto	281,250	2	140,625	,217	,807
Error	12989,583	20	649,479		
Total	122656,250	30			
Corrected Total	19109,375	29			

a. R Squared = ,320 (Adjusted R Squared = ,014)